

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELLEN CAROLINE STORCK

CRESCIMENTO E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE PATCHOULI
EM FUNÇÃO DO REGIME HÍDRICO E BIOESTIMULANTES

CURITIBA

2012

RAFAELLEN CAROLINE STORCK

CRESCIMENTO E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE PATCHOULI
EM FUNÇÃO DO REGIME HÍDRICO E BIOESTIMULANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração em Produção
Vegetal, Departamento de Fitotecnia e
Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Professor Orientador: Dr. Cícero
Deschamps

CURITIBA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL





PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **RAFAELLEN CAROLINE STORCK**, sob o título "**CRESCIMENTO E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE PATCHOULI EM FUNÇÃO DO REGIME HÍDRICO E BIOESTIMULANTES**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

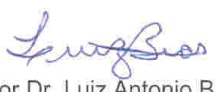
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.


Curitiba, 27 de Março de 2012.


Professora Dra. Louise Larissa May De-Mio
Coordenadora do Programa


Professor Dr. Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto
Primeiro Examinador


Professora Dra. Érica Amano
Segunda Examinadora


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Terceiro Examinador


Professor Dr. Afila Francisco Mógor
Quarto Examinador


Professor Dr. Cicero Deschamps
Presidente da Banca e Orientador

Ao meu esposo Elton.

Ao nosso bebê Arthur.

À nossa amada Lucy.

Dedico

*Aos meus pais Bruno e Ragnit por não medirem
esforços para apoiar a minha formação.*

Às minhas irmãs Susan e Bruna pelo amor e carinho

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e da sabedoria em momentos difíceis.

Ao professor Cícero Deschamps pela orientação ao longo de seis anos de trabalhos conjuntos.

A professora Erika Amano pela incansável orientação e auxílio nos experimentos de anatomia vegetal.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal especialmente aos professores Luiz Antonio Biasi, Átila Mógor e Katia Zuffellato-Ribas pelas contribuições aos trabalhos e participações em bancas de pré-defesa e qualificação.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Fitotecnia Maria Emília e Sr. Rainerio pela ajuda nos trabalhos conduzidos em casa de vegetação.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia em especial aos amigos Rodrigo, Vera, Cristina, Magda, César, Marcelle e Lury pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração.

Ao Dr. Humberto Bizzo pela colaboração na análise dos óleos essenciais.

Ao aluno do Curso de Agronomia Jonathan Heinrichs pelo auxílio no processamento dos materiais nos experimentos de anatomia.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal pela oportunidade de crescimento profissional.

A Capes pela bolsa de estudos concedida.

A todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

RAFAELLEN CAROLINE STORCK, filha de Bruno Storck Júnior e Ragnit Maud Bormann. Nascida no município de União da Vitória, estado do Paraná em 06 de agosto de 1982. Casada com Elton de Souza desde o dia 13 de novembro de 2010 com que espera um filho que se chamará Arthur.

Concluiu o ensino fundamental e médio no Colégio Santos Anjos em Porto União – SC. Em agosto de 2005 formou-se Bacharel em Ciências Biológicas – Biotecnologia pela Universidade do Vale do Itajaí (Univali), em Itajaí – SC.

Em março de 2006 ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal recebendo o título de mestre em fevereiro de 2008. No mês de março do mesmo ano tornou-se aluna regular do curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal no nível de doutorado.

RESUMO

Pogostemon cablin (Blanco) Benth., popularmente conhecido como patchouli, é uma espécie aromática pertencente a família Lamiaceae. Sua utilização por parte de indústrias de higiene e perfumaria se deve ao óleo essencial que este possui, o qual apresenta atividades farmacológicas, além de conferir capacidade de fixação à pele e aroma amadeirado às composições a base deste. As propriedades do óleo essencial de patchouli estão fortemente relacionadas à presença de seus constituintes majoritários patchoulol e pogostol. O objetivo deste trabalho foi descrever características anatômicas, fisiológicas, bioquímicas, do desenvolvimento vegetativo, produtividade e composição do óleo essencial desta espécie, quando submetido a teores decrescentes de umidade do substrato, com e sem aplicação de bioestimulante e seus compostos de forma isolada. O bioestimulante utilizado foi o produto de nome comercial Plenno® composto pela associação do extrato de alga marinha *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, ácido L-glutâmico e cálcio. Com base nos resultados obtidos nos experimentos foi possível observar a presença de células contendo óleo essencial em todos os órgãos vegetativos de patchouli. Entretanto, estas células são observadas com maior frequência nas folhas. Além disto, é possível observar a presença de gotículas de óleo essencial e idioblastos permeando todo o parênquima clorofiliano paliçádico. Também é possível distinguir seis tipos de tricomas com morfologia e padrão de distribuição distinta. Em condições de baixo suprimento hídrico ocorre a diminuição do desenvolvimento vegetativo e produtividade do óleo essencial, bem como alterações bioquímicas e fisiológicas desfavoráveis ao desenvolvimento vegetativo desta espécie. Além disto, ocorre a diminuição da espessura do parênquima paliçádico resultando em decréscimo da taxa fotossintética, diminuição dos teores de proteínas solúveis totais e açúcares redutores, e aumento dos teores de aminoácidos e açúcares solúveis totais, temperatura foliar e transpiração das plantas. Entretanto, nestas condições a aplicação de ácido glutâmico promove aumento da área foliar e consequentemente maior produtividade do óleo essencial. Promovendo também, o aumento das concentrações dos constituintes majoritários patchoulol e pogostol no óleo essencial. A aplicação de ácido glutâmico em plantas não irrigadas, também resulta em aumento das concentrações de proteínas solúveis totais, clorofilas *b* e totais e diminui a temperatura foliar das plantas.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; bioestimulantes; suprimento hídrico; óleos voláteis.

ABSTRACT

Pogostemon cablin (Blanco) Benth., as known as patchouli, is an aromatic species belonging to the Lamiaceae family. Its use by industries hygiene and perfume oil is due to the essential that it possesses, which has pharmacological activities, binding capacity gives the skin and woody aroma to the compositions of this base. The properties of essential oil of patchouli are closely related to the presence of its major constituents and patchoulol pogostol. The aim this study was to describe anatomical, physiological, biochemical, vegetative development, yield and essential oil composition of this species, when subjected to decreasing moisture content of the substrate, with and without application of plant growth regulator and its compounds in isolation. Also, the effect of drying time on the yield and composition of the oil. The biostimulant product was used Plenno® trade name made by the association of the extract of *Ascophyllum nodosum* kelp (L.) Le Jolis, L-glutamic acid and calcium. Based on the results obtained in the experiments we observed the presence of cells containing essential oil in all vegetative organs of patchouli. However, these cells are observed more frequently in the leaves. Moreover, it is possible to observe the presence of droplets of essential oil and idioblasts permeating the whole palisade parenchyma. It is also possible to distinguish six types of trichomes morphology and distinct distribution pattern. In conditions of low water supply there is a decrease in vegetative productivity desenvolvimento essential oil, as well as physiological changes bioquímicas and unfavorable to vegetative growth of this species. Moreover, there is a decrease in the thickness of palisade parenchyma, resulting in a decrease in photosynthetic rate, decreased amounts of total soluble proteins and sugars, and increasing concentrations of aminoácidos and total soluble sugars, leaf temperature and transpiration from plants. However, in these conditions the application of glutamic acid promotes increased leaf area and hence higher productivity of the oil. Also promoting the increase of the concentrations of major constituents in pogostol patchoulol and essential oil. The application of glutamic acid in non-irrigated plants, also results in increased concentrations of total soluble proteins, chlorophyll b and total and reduces leaf temperature of plants. For the period of drying plants when it occurs by a two-day period prescribed in temperaturas 65 ° C is observed higher yield of essential oil and the maintenance of satisfactory levels of the major constituent patchoulol the same. In the case of drying at room temperature, the extraction of essential oils to be performed on the fourth day after harvest.

Keywords: Patchouli, biostimulants, water supply, volatile oils.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA	19
2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.3. ESTRUTURAS DE ARMAZENAMENTO E BIOSÍNTESE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM PATCHOULI	21
2.4. FATORES QUE AFETAM A BIOSÍNTESE DE ÓLEOS ESSENCIAIS	23
3. CAPÍTULO II - ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOQUÍMICOS DE ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE PATCHOULI	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
3.1. INTRODUÇÃO	29
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.3. RESULTADOS	30
3.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	33
3.5. CONCLUSÕES	38
3.6. REFERÊNCIAS	39
4. CAPÍTULO III - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI EM TEORES DECRESCENTE DE UMIDADE DO SOLO	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
4.1. INTRODUÇÃO	44
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.4. CONCLUSÕES	54

4.5. REFERÊNCIAS.....	55
5. CAPÍTULO IV - ASPECTOS ANATÔMICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DE PATCHOULI EM DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE DO SOLO	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
5.1. INTRODUÇÃO.....	59
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	60
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.4. CONCLUSÕES	76
5.5. REFERÊNCIAS.....	77
6. CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO, PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PATCHOULI APÓS APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTES EM TEORES DECRESCENTES DE UMIDADE DO SUBSTRATO	81
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
6.1. INTRODUÇÃO	83
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	84
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
6.4. CONCLUSÕES	100
6.5. REFERÊNCIAS.....	101
7. CONCLUSÕES GERAIS	106
8. REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2. 1 - Biossíntese dos compostos do óleo essencial de *Pogostemon cablin* a partir do farnesil difosfato (DEGUERRY et al., 2006, adaptada de Croteau et al., 1987). 22
- Figura 3. 1 - Raiz de crescimento primário (1) observe a presença da epiderme unisseriada (A), córtex com células parenquimáticas (B), endoderme (C) e cilindro vascular com estrutura pentarca (D). Raiz de crescimento secundário (2) onde E representa a periderme e F o córtex. Caule de crescimento primário (3) com presença de epiderme unisseriada e tricomas (G), colênquima angular com 5-6 camadas de células (H) e xilema em fileiras radiais de quatro células (I). Caule de crescimento secundário (4) as setas indicam periderme inicial (J) e colênquima (K). Pecíolo (5) epiderme unisseriada (L) e sistema vascular colateral (M). Lâmina foliar (6) observe a epiderme unisseriada com presença de tricomas (N), parênquima paliádico clorofiliano (O) e parênquima lacunoso (P)..... 35
- Figura 3. 2 – Observe a presença de tricoma glandular unicelular com pedúnculo reduzido (1), tricoma glandular com duas células e pedúnculo reduzido (2), tricoma glandular pedunculado e com duas células (3), tricoma glandular pedunculado unicelular (4 e 5) e tricomas tectores contendo de 2 a 3 células (6). 36
- Figura 3. 3- Aspecto geral da secção transversal da lâmina foliar de patchouli. As setas (1) indicam a presença de idioblastos contendo substâncias lipídicas, evidenciadas pela reação com Sudan III. Detalhe das células do parênquima clorofiliano paliádico (2), as setas indicam a presença de gotículas de óleo essencial permeando o parênquima..... 37
- Figura 4. 1 - Distribuição das plantas em casa-de-vegetação divididas em dois grupos (com e sem irrigação). Observe os cinco tempos de avaliação do experimento representados por “T”. A letra “R” indica as repetições dos tratamentos e a letra “P” representa as quatro plantas que compõem cada repetição. 46
- Figura 4. 2 - Observe o esquema de condução do experimento. Do momento do plantio das mudas até completarem 88 dias as plantas recebem irrigação em dias alternados (200 mL de água). Após este período o primeiro grupo de plantas é irrigado diariamente e o segundo grupo de plantas tem suspensão total da irrigação. Os dias 0; 3; 6; 9; 12 e 15 representam os 5 períodos de avaliação do experimento e o total de dias em que as plantas permaneceram nestas condições. 46

Figura 4. 3 - Porcentagem de umidade do substrato nos diferentes períodos de avaliação do experimento em condições de manutenção e suspensão da irrigação.	47
Figura 4. 4 – Altura (cm) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.	48
Figura 4. 5 – Número de folhas das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.	49
Figura 4. 6 – Área foliar (cm ²) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.	50
Figura 4. 7 – Massa seca de folhas (g) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	51
Figura 4. 8 – Massa seca de ramos (g) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	51
Figura 4. 9 – Número de ramos das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.	52
Figura 4. 10 – Teor de óleo essencial (%) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação.	

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....53

Figura 5. 1 - Umidade do substrato em condições de irrigação e suspensão de irrigação durante os períodos de avaliação do experimento.61

Figura 5. 2 – Umidade relativa do ar (UR) e radiação ($\mu \text{ mol. s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) no interior da casa de vegetação durante o período de avaliação do experimento.61

Figura 5. 3 – Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.63

Figura 5. 4 - Concentração de aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.64

Figura 5. 5 - Concentração de açúcares solúveis totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.65

Figura 5. 6 - Concentração de açúcares redutores totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.66

Figura 5. 7 - Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.67

- Figura 5. 8 - Concentração de clorofila *b* ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 67
- Figura 5. 9 - Concentração de clorofilas totais ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 68
- Figura 5. 10 - Concentração de carotenóides ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 68
- Figura 5. 11 – Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 69
- Figura 5. 12 – Resistência estomática (s cm^{-1}) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 70
- Figura 5. 13 – Transpiração ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{s}^{-1}$) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 71
- Figura 5. 14 – Espessura da epiderme abaxial (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de

avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 71

Figura 5. 15 - Espessura da epiderme adaxial (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 72

Figura 5. 16 - Espessura do parênquima paliádico (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 73

Figura 5. 17 - Espessura do parênquima lacunoso (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 74

Figura 5. 18 - Espessura da lâmina foliar total (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 74

Figura 6. 1 – Esquema da condução do experimento em casa-de-vegetação. Dia zero indica o plantio das mudas com irrigação em dias alternados até 80 dias após o plantio. Aos 80 dias as plantas são subdivididas em grupos com suspensão total da irrigação e irrigação constante. Aos 90 dias após o plantio é retomada a irrigação das plantas em dias alternados. Dia 100 indica o momento da coleta das plantas para avaliação. Observe as setas, estas indicam o momento das aplicações dos bioestimulantes e seus compostos isolados. 86

Figura 6. 2 - Porcentagem de umidade do substrato do momento do início da aplicação dos tratamentos (80 dias) em plantas constantemente irrigadas e com ausência total de irrigação (80 a 90 dias) e após a retomada da irrigação em dias alternados até o momento da coleta das plantas (90 a 100 dias). 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 – Distribuição de Tricomas Glandulares e Tectores, células oleíferas e idioblastos nos diferentes órgãos vegetativos de patchouli.	38
Tabela 3. 2 – Testes histoquímicos realizados nos diferentes órgãos vegetativos de patchouli.	38
 Tabela 4. 1 - Composição do óleo essencial de patchouli em diferentes períodos e níveis de umidade do substrato.....	54
 Tabela 6. 1- Altura (cm), número de folhas, área foliar (cm ²) e número de ramos de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e após a aplicação de bioestimulantes e seus compostos isolados. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).....	90
Tabela 6. 2 - Teor (%) e produtividade (L.ha ⁻¹) do óleo essencial de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e aplicação de bioestimulante. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).....	91
Tabela 6. 3 - Composição do óleo essencial de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e aplicação de bioestimulantes. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).....	94
Tabela 6. 4 - Concentração de açúcares solúveis totais (µg.mg ⁻¹ massa fresca), açúcares redutores (µg.mg ⁻¹ massa fresca), proteínas solúveis totais (µg.mg ⁻¹ massa fresca) e aminoácidos solúveis totais (µg.mg ⁻¹ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).....	97
Tabela 6. 5 - Concentração de clorofila <i>a</i> (µg.mg ⁻¹ massa fresca), clorofila <i>b</i> (µg.mg ⁻¹ massa fresca), clorofilas totais (µg.mg ⁻¹ massa fresca) e carotenóides (µg.mg ⁻¹ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).	98
Tabela 6. 6 - Temperatura foliar (°C), resistência estomática (diff. Res. s cm ⁻¹) e transpiração (µg cm ⁻² s ⁻¹) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus	

compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).....	99
---	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

Muitos vegetais apresentam misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis chamados de óleos essenciais (TAIZ & ZEIGER, 2004). Também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas (SILVA & CASALI, 2000) e conferem a estas, grande importância econômica. No que diz respeito ao óleo essencial do patchouli sua importância econômica está relacionada principalmente a sua capacidade de fixação à pele e a sua fragrância amadeirada (SUGIMURA et al., 2005), sendo amplamente utilizado pelas indústrias de perfumarias (HSU et al., 2006).

Os componentes dos óleos essenciais pertencem a duas classes quimicamente distintas, terpenóides e fenilpropanóides. Estes são sintetizados a partir de diferentes precursores metabólicos primários e são produzidos por meio de rotas biossintéticas diferentes. Os óleos essenciais são sintetizados, armazenados e liberados através de estruturas do mesofilo ou da epiderme (SANGWAN et al., 2001).

A biossíntese de óleos essenciais em plantas aromáticas está condicionada a fatores ambientais e fisiológicos que interagem entre si e podem levar à produção de diferentes metabólitos secundários (CASTRO, 2004). Deste modo, fatores como temperatura, radiação, disponibilidade hídrica (FAROOQI et al., 1999), fotoperíodo, ontogenia da planta e a aplicação de reguladores vegetais podem alterar a produção de óleos essenciais em plantas aromáticas (SHUKLA & FAROOQI, 1990; SANGWAN et al., 2001). Recentemente, tem sido discutida a aplicação de compostos a base de algas marinhas, isolados ou em combinação com outros produtos tais como nutrientes, vitaminas e reguladores vegetais sobre a biossíntese de óleos essenciais, demonstrando que pode haver alterações no rendimento e composição do óleo quando estes são aplicados (STORCK, 2008; MASETTO, 2009).

Segundo Bizzo et al. (2009) as atividades relacionadas à produção de óleos essenciais no Brasil, tem se demonstrado viáveis e rentáveis. Entretanto, há necessidade de formação de novas parcerias entre instituições de pesquisas, setores públicos e privados para o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo e melhoramento de plantas, com o objetivo de se obter uma matéria prima aprimorada e consequentemente óleos essenciais com elevada qualidade e preço competitivo no mercado internacional.

Devido à importância econômica do óleo essencial produzido pelo patchouli, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da secagem, de diferentes teores de umidade

do substrato e da aplicação de bioestimulantes no desenvolvimento vegetativo, teor, produtividade e composição de óleos essenciais, metabolismo e alterações anatômicas em plantas de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Para alcançar estes objetivos foram realizados dois experimentos em condições de casa de vegetação. Buscando-se aprimorar a discussão dos resultados obtidos estes foram subdivididos em capítulos.

No Capítulo I é apresentada a revisão geral da literatura, o Capítulo II consiste na descrição anatômica detalhada dos órgãos vegetativos da espécie estudada. O efeito dos diferentes níveis de umidade do substrato sobre o desenvolvimento vegetativo e produção de óleos essenciais, bem como aspectos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos das plantas de patchouli submetidas a estas condições são descritas nos Capítulos III e IV respectivamente. O Capítulo V contempla o desenvolvimento vegetativo e a produção de óleos essenciais de plantas, bem como alterações bioquímicas e fisiológicas de plantas de patchouli submetidas a diferentes níveis de umidade do substrato após a aplicação de bioestimulante e seus compostos de forma isolada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A família Lamiaceae compreende cerca de 300 gêneros, entre eles *Pogostemon*, com aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todo o mundo. No Brasil ocorrem aproximadamente 26 gêneros com 350 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). São plantas frequentemente, herbáceas ou arbustivas, com glândulas que produzem óleo essencial. Suas folhas apresentam filotaxia oposta e cruzada, inteiras e com cheiro intenso. Flores pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares (JOLY, 1996).

Pogostemon cablin (Blanco) Benth, popularmente conhecido como patchouli, é originário Ásia, sendo cultivado em diversos países tais como Caribe, China, Índia, Indonésia, Malásia, Filipinas, África, Vietnã e Brasil (MIYAZAWA et al., 2000; SINGH et al., 2002; ZHAO et al., 2005; WU et al., 2008). Possui hábito perene, sua altura pode variar entre 0,6 a 1,0 m de comprimento, filotaxia oposta e folhas ovaladas. Em geral se desenvolve bem em ambientes semi-sombreados, com precipitação anual acima de 2.000 mm, temperaturas entre 24 e 28°C e altitude de zero a 1.200 m, sendo preferíveis as altitudes de zero até 400 m. Possui exigência por solos corrigidos e bem supridos de nutrientes (EPAGRI, 2004).

2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

Muitos vegetais apresentam misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, chamados óleos essenciais, os quais conferem aroma característico as suas folhas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Diversas espécies vegetais são capazes de armazenar estes óleos essenciais em células especializadas (RIZZINI & MORS, 1995), os quais são provenientes do metabolismo secundário e conferem às plantas grande importância econômica, principalmente no que diz respeito à indústria alimentícia e farmacêutica (PIMENTEL et al., 2006). A presença de óleos essenciais determina a utilização de diversas espécies da família Lamiaceae para fins medicinais, na qual estão incluídas muitas ervas aromáticas cultivadas no Brasil (SOUZA & LORENZI, 2005).

Os óleos essenciais são constituídos predominantemente por terpenos, entretanto, muitos destes óleos podem ser constituídos, também, por fenilpropenos que quando presentes agregam sabor e odor ao óleo essencial. Grande parte destes compostos apresentam uma

composição extremamente complexa relacionada a uma grande variedade e funcionalidade química das diversas classes de compostos tais como, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, entre outros (SANGWAN et al., 2001). A volatilidade de alguns terpenos faz com que estes compostos sejam facilmente perceptíveis nos aromas das plantas e prontamente obtidos por destilação de órgãos vegetais (CASTRO et al., 2004).

O óleo essencial produzido por *Pogostemon cablin* contribui em muitas atividades farmacológicas, e suas propriedades terapêuticas estão diretamente relacionadas à qualidade e a quantidade deste (HU et al., 2005). Sendo muito apreciado por parte de indústrias de perfumarias, cosméticos e higiene oral. Há mais de um século é conhecido o fato de que seu constituinte majoritário, patchoulol, é o componente responsável pelo aroma amadeirado característico deste óleo e pela sua capacidade de fixação à pele (SUGIMURA et al., 2005; ZHAO et al., 2005; HSU et al., 2006). Além de propriedades aromáticas, o óleo essencial de patchouli, possui também propriedades farmacológicas que podem variar de acordo com a sua composição (GUBAREVA et al., 2004; KISO et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado propriedades anti-fúngicas, anti-helmínticas, anti-tripanosomas, anti-eméticas, anti-inflamatórias e de analgesia do óleo essencial de patchouli (ZHAO et al., 2005; LU et al., 2011). Em relação ao constituinte majoritário patchoulol, é descrito que possui atividade anti-influenza A (H1N1 e H2N2), indicando que este pode ser um elemento potencial para o uso por parte de indústrias farmacêuticas como um agente anti-influenza (KIYOHARA et al., 2011; WU et al., 2011).

Vários trabalhos têm demonstrado a presença de alguns sesquiterpenos na composição dos óleos voláteis de *Pogostemon* (HSU et al., 2006) tais como o patchoulol, patchouleno, bulneseno, guaiano, cariofileno (SUGIMURA et al., 2005). Com base na literatura pesquisada, os constituintes mais abundantes do óleo essencial de patchouli são: patchoulol, alfa-bulneseno, alfa-guaiano, gama-patchouleno, gama-gurjuneno, germacreno-D, acifileno, 7-epi-alfa-selineno (SILVA et al., 2004; BURÈ & SELLIER, 2004), podendo ocorrer também a presença dos compostos: beta-elemeneno, beta-patchouleno, cariofileno, alfa-patchouleno e seicheleno (SINGH et al., 2002; HU et al., 2003; ZHU et al., 2003).

Segundo a International Organization for Standardization (ISO), que normatiza a qualidade dos óleos essenciais, o óleo de patchouli deve apresentar em sua composição os seguintes teores dos constituintes: beta-patchouleno (1,8%-3,5%), copaeno (traços-1%), alfa-guaiano (11%-16%), beta-cariofileno (2%-5%), bulneseno (13%-21%), nor-patchoulol (0,35%-1%) patchoulol (27%-35%), gama-patchouleno (1,8%-3,5%) e pogostol (1%-2,5%) (ISO, 2002).

2.3. ESTRUTURAS DE ARMAZENAMENTO E BIOSSÍNTESE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM PATCHOULI

Os óleos voláteis de plantas aromáticas são sintetizados, armazenados e liberados para o ambiente por meio de estruturas presentes na epiderme ou no mesofilo, as quais possuem características relacionadas a grupos taxonômicos. Estas estruturas podem estar presentes nas folhas, raízes, caules, flores e frutos, e incluem células, glândulas secretoras ou tricomas (SANGWAN et al., 2001).

Estudos anatômicos demonstram a presença de glândulas e reservatórios no espaço subcuticular foliar em Lamiaceae (GERSHENZON et al., 2000) podendo haver também tricomas glandulares e peltados, onde a presença destes pode variar entre as espécies da família (GERSBACH, 2001). Em *Pogostemon cablin* estão presentes dois tipos de tricomas, tectores, em maior quantidade, e tricomas glandulares presentes em menor quantidade. A concentração de tricomas nas folhas pode aumentar em até 10 vezes quando comparado a ramos e pecíolos, podendo haver também células internas especializadas em acumular óleo (HENDERSON et al., 1970).

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por meio de duas rotas metabólicas distintas, na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil - CoA são ligadas formando o ácido mevalônico, um importante intermediário utilizado na geração do isopentenil difosfato (IPP) sendo o IPP, a unidade ativa básica na formação de terpenos. Entretanto, o IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono através da rota do metileritriol fosfato (MEP) (SANGWAN et al., 2001).

Segundo Deguerry et al. (2006), os componentes do óleo essencial do patchouli são formados a partir do farnesil-difosfato que sofre alterações estruturais dando origem a dois intermediários humulil cátion e E,E – germacradienil cátion (Figura 2.1), este último é o responsável pela síntese do pogostol e do patchoulol, compostos majoritários no óleo essencial desta espécie. Sendo o sesquiterpeno patchoulol o responsável pela nota do óleo essencial.

Tanto a síntese do patchoulol quanto do pogostol ocorre em presença de água, entretanto, na ausência de água os mesmos intermediários que dão origem a esses compostos originam o seicheleno e o alfa guaieno, alfa buleseno e guaia-4,11-dieno respectivamente.

Nestas reações, ocorre desprotonização e a molécula de água não é utilizada como substrato, sabendo-se que a síntese destes não é dependente da quebra de uma molécula de água, sugere-se que a concentração destes constituintes no óleo essencial é diretamente dependente do balanço dos constituintes patchoulol e pogostol, tendo em vista a presença de precursores comuns. A biossíntese de patchoulol e seichelene possui como precursor comum o intermediário número 7 da rota metabólica. Entretanto, na síntese de pogostol, alfa guaieeno e alfa buleseno o precursor comum é o guaianil cátion.

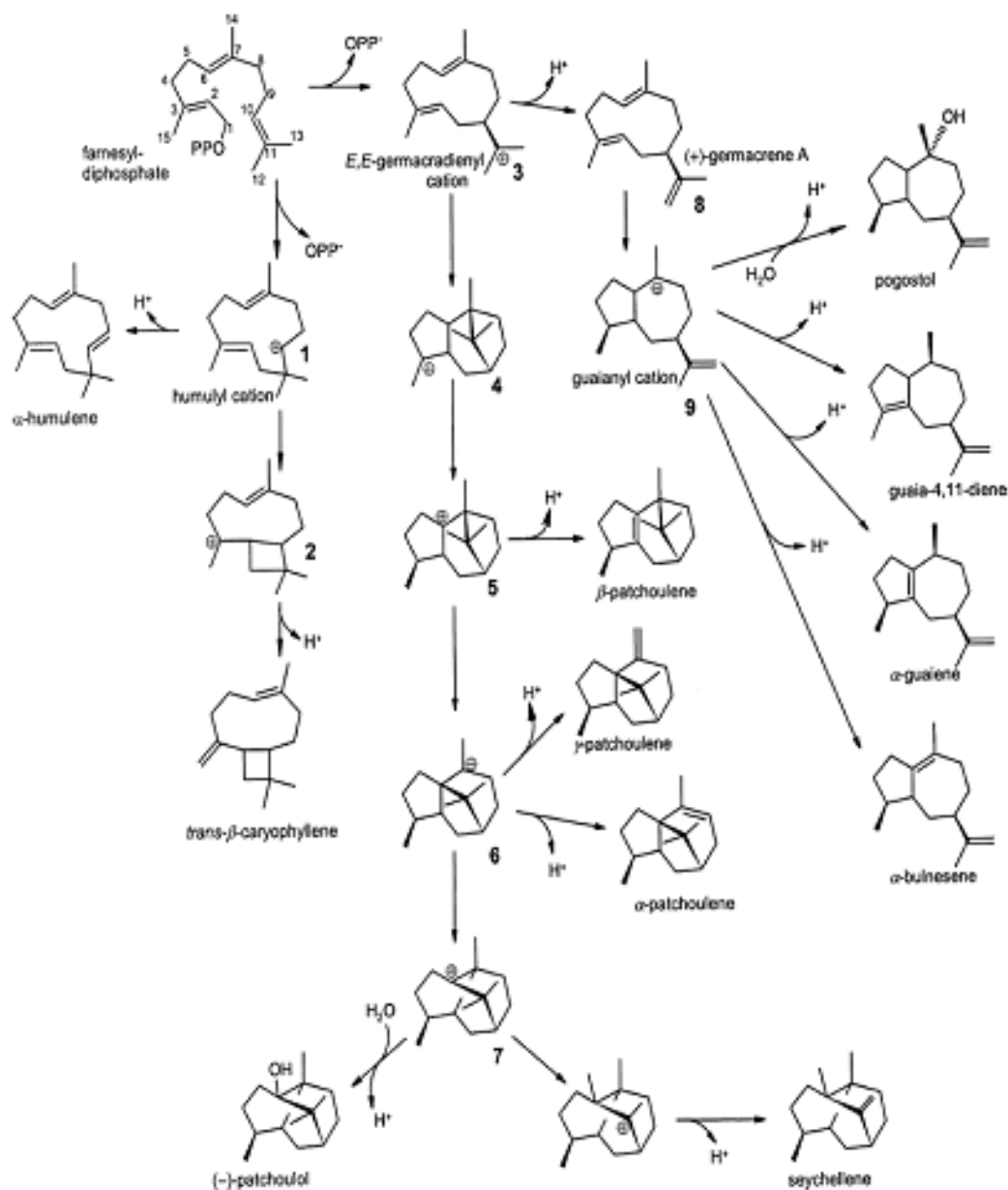


Figura 2. 1 - Biossíntese dos compostos do óleo essencial de *Pogostemon cablin* a partir do farnesil difosfato (DEGUERRY et al., 2006, adaptada de Croteau et al., 1987).

2.4. FATORES QUE AFETAM A BIOSÍNTESE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Alguns fatores ambientais incluindo estímulos bióticos e abióticos podem regular a biossíntese de compostos secundários em plantas (ZHI-LIN et al., 2007). Deste modo, a biossíntese de óleos essenciais não está condicionada somente ao estado metabólico da planta, fatores como crescimento vegetativo, idade foliar, temperatura, disponibilidade hídrica, intensidade e duração da radiação solar podem alterar a produção de óleos essenciais (FAROOQI et al., 1999).

A biossíntese dos metabólitos secundários está condicionada a fatores ambientais que interagindo com características genéticas influenciam aspectos fisiológicos da espécie (CASTRO et al., 2004). Deste modo, a deficiência hídrica não limita apenas o crescimento e a sobrevivência do vegetal, mas induz também nestes várias respostas fisiológicas e metabólicas (SANGWAN et al., 2001).

O efeito do estresse hídrico sobre a produção de compostos secundários pode variar de acordo com a sua intensidade e duração, podendo aumentar ou reduzir a biossíntese de óleos essenciais (ADRADE & CASALI, 1999).

Em plantas de *Rosmarinus officinalis* L. a deficiência hídrica resultou em decréscimo na produção do óleo essencial, bem como na produção de compostos fenólicos (SOLINAS et al., 1996). Segundo Silva et al. (2002) a deficiência hídrica severa diminuiu o crescimento, a produção de biomassa e o teor de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel., entretanto, não houve diferença na composição do óleo essencial nos diferentes regimes hídricos.

Pirzad et al. (2006) demonstraram em camomila alemã (*Matricaria chamomilla* L.) que tanto o excesso, quanto o déficit hídrico reduziram os teores de óleos essenciais, devido alterações estruturais e metabólicas nestas plantas. Por outro lado, *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum americanum* L. apresentaram maiores porcentagens de óleos essenciais bem como alterações na composição do óleo quando submetidos ao estresse hídrico (KHALID, 2006). Em plantas de cominho (*Carum carvi* L.) houve acréscimo no teor de monoterpenos do óleo essencial quando as plantas foram submetidas a um déficit hídrico moderado. Ainda em relação a esta espécie observou-se que o déficit hídrico promove decréscimo do metabolismo primário, entretanto, promove o acréscimo da produção de metabólitos secundários (LARIBI, et al., 2009).

Ao comparar o efeito de diferentes regimes hídricos em gerânio (*Pelargonium capitatum* X *P. radens*), foi possível observar que plantas submetidas a estresse hídrico apresentaram maior teor de óleo essencial sem alteração de seus constituintes (EIASU et al., 2009). Por outro lado, em salvia (*Salvia officinalis* L.) o déficit hídrico moderado promoveu aumento do rendimento do óleo e dos compostos considerados majoritários, cânfora, alfatujona e 1,8 –cineol (BETTAIEB et al., 2009).

Bioestimulante é uma mistura de um ou mais reguladores vegetais com outros compostos de natureza bioquímica diferente, tais como, aminoácidos, nutrientes e vitaminas (VIEIRA, 2001). Deste modo, o extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* pode ser considerado um bioestimulante, pois, possui em sua composição zeatina ribosídeo ($66 \mu\text{g.g}^{-1}$) e de isopentil adenina (iPA) ($4 \mu\text{g.g}^{-1}$) e outros compostos orgânicos (ZHANG & ERVIN, 2004).

A aplicação foliar do extrato de alga marinha em plantas de *Lavandula dentata* L. alterou a composição do óleo essencial (MASETTO, 2009). Em *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., a aplicação de 15 mg.L^{-1} de extrato de alga marinha aumentou a produtividade do óleo essencial e as concentrações do constituinte majoritário patchoulol. Por outro lado, a aplicação de 30 mg.L^{-1} de extrato de alga marinha reduziu a produtividade do óleo essencial (STORCK, 2008).

As adaptações bioquímicas das plantas a diferentes ambientes envolvem o metabolismo primário e secundário destas (CARVALHO et al., 2006). Mógor et al. (2008) relatam o efeito bioestimulante do composto contendo extrato de alga marinha, cálcio e ácido L - glutâmico em *Phaseolus vulgaris* L., promovendo maior crescimento inicial destas plantas. Sabendo-se que alterações nos processos de síntese primários estão relacionados com a produção de compostos secundários, sugere-se que compostos capazes modificar o desenvolvimento vegetativo sejam capazes também de promover alterações na produção de compostos secundários.

As respostas das células ao estresse incluem alterações no padrão de divisão celular, arquitetura da parede celular e produção de compostos osmorreguladores tais como prolina e glicina betaína. O estresse hídrico causado pela seca desenvolve-se de maneira gradual, e há uma sequência de eventos que ocorrem, sendo a primeira e a mais sensível resposta ao déficit hídrico a diminuição do crescimento em consequência da redução da turgescência (TAIZ & ZEIGER, 2004; LARCHER, 2006).

A expansão celular, síntese da parede celular e síntese protéica estão entre os processos mais sensíveis ao déficit hídrico, podendo indicar que a redução da expansão foliar é uma das primeiras respostas a pouca água disponível, já que esse processo é dependente do crescimento celular (SADRAS & MILROY, 1996).

Em resposta ao estresse hídrico plantas de *Salvia officinalis* L. apresentaram ramos com menor diâmetro contendo menor número de folhas e folhas menores quando comparadas a testemunha. Este comportamento poderia estar relacionado a realocação de fotoassimilados para formação de raízes ou a diminuição do conteúdo de clorofilas e conseqüentemente redução da eficiência fotossintética destas plantas (BETTAIEB et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados em *Mentha spicata* L. e *Rosmarinus officinalis* L. submetidas a estresse hídrico. Nestas plantas foi possível observar uma redução de biomassa e declínio fotossintético, provavelmente relacionado a diminuição da atividade fotoquímica e da rubisco (DELFINE et al., 2005).

Segundo Carvalho et al. (2006) o acúmulo de prolina e de clorofilas em folhas totalmente expandidas pode ser considerado um parâmetro para avaliação do estresse hídrico em plantas. Estes autores, observaram em artemísia (*Tanacetum parthenium* L. Schultz – Bip.), maior acúmulo de prolina em plantas submetidas a deficiência hídrica em decorrência de um ajustamento osmótico causado por estresse hídrico. Por outro lado, os teores de clorofilas nessas plantas decresceram indicando uma tendência à senescência nestas condições.

Metabólitos são produtos finais do metabolismo celular, e são importantes indicadores de como sistemas biológicos respondem à alterações do ambiente (FIEHN, 2002). Liu et al. (2007), observaram em plantas *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim., que as concentrações de alguns metabólitos são altamente modificadas em função da desidratação. As concentrações de sacarose nos tecidos foliares tendem a aumentar logo quando as plantas são submetidas a seca e se mantêm altas até o final deste período. Entretanto, as concentrações de glicose tendem a decrescer. Os níveis de prolina têm resposta semelhante aos da sacarose.

Zhang e Ervin (2004) ao estudarem o efeito da aplicação do extrato de alga marinha *Asophyllum nodosum* em gramíneas, observaram que este aumentou a resistência das plantas à seca mantendo sua eficiência fotossintética. Em plantas de *Phaseolus vulgaris* L., a aplicação do bioestimulante contendo extrato de alga marinha, ácido glutâmico e cálcio também

promoveu maior tolerância a restrição hídrica. Os níveis de prolina e clorofilas foram superiores nestas plantas quando aplicado este bioestimulante.*¹

Em relação a alterações anatômicas, plantas de *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim decorrentes do baixo suprimento hídrico apresentaram uma severa desorganização das células do mesofilo, o qual apresentava irregulares espaços de ar. Os cloroplastos dessas plantas deixaram de apresentar o formato elíptico encontrados na testemunha e houve uma completa desestruturação das membranas dos tilacóides (LIU et al., 2007).

Em plantas de cidrão (*Hedyosmum brasiliense* Mart.) a deficiência hídrica promoveu acréscimo dos teores de prolina nas folhas, aumentou a densidade estomática e de células epidérmicas por milímetro quadrado. Por outro lado, promoveu redução da área foliar, do tamanho das células epidérmicas e estomáticas e a espessura da lâmina foliar (MACHADO, 2004).

* Comunicação pessoal de Átila Mógor em 09 de março de 2012.

3. CAPÍTULO II - ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOQUÍMICOS DE ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE PATCHOULI

RESUMO

Patchouli pertence à família Lamiaceae a qual possui diversas propriedades medicinais e aromáticas. A anatomia vegetal constitui-se de uma importante ferramenta auxiliar na morfodiagnose de espécies medicinais, podendo também ser utilizada para auxiliar no manejo correto destas espécies, localizando estruturas de armazenamento de compostos secundários. O objetivo deste trabalho foi caracterizar anatômica e histoquímicamente órgãos vegetativos de patchouli visando observar a presença de possíveis órgãos produtores de óleos essenciais, além de caracterizar parâmetros que possam ajudar a identificação da espécie tendo em vista seu potencial aromático e farmacológico. Foram obtidas secções transversais de raiz e caule em crescimento primário e secundário, pecíolo e lâmina foliar, as quais foram submetidas à testes histoquímicos para descrição anatômica. Foi possível observar a presença de gotículas de óleo essencial no parênquima clorofiliano paliçádico, bem como células contendo óleo essencial em todos os órgãos vegetativos, entretanto com maior frequência na lâmina foliar. Em relação aos tricomas, foram observados seis morfotipos distintos e a presença de cada morfotipo varia conforme o órgão vegetativo avaliado.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; estruturas secretoras; células oleíferas.

ANATOMICAL ASPECTS AND HISTOCHEMISTRY OF THE VEGETIVE ORGANS OF PATCHOULI

ABSTRACT

Patchouli belongs to the Lamiaceae family which has many medicinal and aromatic properties. The plant anatomy is an important tool to assist in morpho diagnose of medicinal species and it can also be used to help in correct production of these species, localizing the storage structures of secondary compounds. The objective of this study was to characterize the anatomy and histochemical of the vegetative organs of patchouli in order to observe the possible presence of essential oil-producing organs, and to determine parameters that may help to identify the species because of its aromatic and pharmacological potential. Cross-sections of root and stem growth in primary and secondary leaves, petiole and leaf blade were obtained and submitted to histochemical tests for anatomical description. It was possible to observe the presence of droplets of essential oil in the palisade parenchyma, as well as cells containing essential oil in all vegetative organs, but more frequently in the leaf blade. In relation to the trichomes, it was observed six morphotypes and the presence of each one varied according to the vegetative organ.

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; secretory structures; oil cells.

3.1.INTRODUÇÃO

Pogostemon cablin (Blanco) Benth. (patchouli) é uma espécie aromática pertencente à família Lamiaceae. Originário da Ásia, entretanto, tem sido cultivado em diversos países orientais e ocidentais, incluindo o Brasil. É uma planta perene de hábito herbáceo, com glândulas que produzem óleo essencial (MIYAZAWA et al., 2000; SINGH et al., 2002; SOUZA & LORENZI, 2005; ZHAO et al., 2005; WU et al., 2008).

O óleo essencial produzido pelo patchouli é amplamente utilizado por indústrias de cosméticos e de perfumarias. Além de propriedades aromáticas, o óleo essencial de patchouli, possui também propriedades farmacológicas que podem variar de acordo com a composição do óleo (GUBAREVA et al., 2004; KISO et al., 2004; ZHAO et al., 2005). Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas ao óleo essencial estão às atividades anti-fúngicas e anti-helmínticas. Recentemente tem-se atribuído também atividades anti-influeza (H1N1 e H2N2) ao composto majoritário patchoulol do óleo essencial de patchouli (KIYOHARA et al., 2011; WU et al., 2011).

Os óleos voláteis de plantas aromáticas são sintetizados, armazenados e liberados para o ambiente por meio de estruturas presentes na epiderme ou no mesofilo, as quais possuem características relacionadas a grupos taxonômicos. Estas estruturas podem estar presentes nas folhas, raízes, caules, flores e frutos, e incluem células, glândulas secretoras ou tricomas (SANGWAN et al., 2001).

Deste modo, a anatomia vegetal constitui-se uma ferramenta auxiliar na morfodiagnose de espécies medicinais, e controle de seu uso em produtos de origem vegetal ou *in natura*. Além de auxiliar no manejo correto da espécie, localizando estruturas de armazenamento de compostos secundários (MING, 1994; DUARTE & MENARIM, 2006; LEITE et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização anatômica e histoquímica de órgãos vegetativos de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. visando observar a presença de possíveis órgãos produtores de óleo essencial, pois atualmente o óleo essencial desta espécie é extraído somente de suas folhas. Além de caracterizar parâmetros que possam ajudar a identificação da espécie tendo em vista seu potencial aromático e farmacológico.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. foram coletadas na Estação Experimental do do Canguiri da Universidade Federal do Paraná, no município de Pinhais, estado do Paraná. Esta região é denominada Primeiro Planalto Paranaense e localiza-se entre as coordenadas 25°25' latitude sul e 49°08' longitude oeste. Após a coleta do material vegetal foram confeccionadas estacas com seis cm de comprimento e um par de folhas reduzidas a metade, as quais foram transferidas para vasos (17 cm de altura e 23 cm de diâmetro) com capacidade para 6 Kg de substrato (solo). As plantas provenientes de estaquia foram mantidas em condições de casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – PR) durante os meses de fevereiro de 2010 a janeiro de 2011.

Foram obtidas secções transversais de plantas com 11 meses de idade utilizando-se raiz e caule em crescimento primário e secundário, pecíolo e lâmina foliar de amostras emblocadas em polietilenoglicol 1500 (GERLACH, 1984) e extraídas da região correspondente ao quarto par de folhas totalmente expandido das plantas. Secções de 10µm foram confeccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2145) e submetidos à dupla coloração com azul de astra e safranina (KRAUS & ARDUIN, 1997). Para os testes histoquímicos, utilizou-se Lugol para a observação de amido, Sudan III, IV e Black B para a observação de lipídeos (JOHANSEN, 1940), cloreto férrico (JENSEN, 1962) e floroglucina para observar a presença de lignina (JOHANSEN, 1940). Lâminas semi-permanentes foram confeccionadas com glicerina, sobre as quais foram depositadas lamínulas e vedadas com esmalte incolor.

As observações e fotomicrografias para descrição anatômica foram realizadas câmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX51.

3.3. RESULTADOS

A raiz em crescimento primário possui epiderme unisseriada. Córtex formado de células parenquimáticas e significativos espaços intercelulares. O córtex é delimitado internamente por uma endoderme bastante característica com espessamento de parede pouco evidente. A endoderme é formada por células menores e mais retangulares se comparadas com as células parenquimáticas do córtex. Internamente, o periciclo, é formado por uma camada de células parenquimáticas. O cilindro vascular possui estrutura pentarca. Com pólos de protoxilema exarco bem evidentes e alternados com floema. O câmbio vascular encontra-se em início de

desenvolvimento, sendo observadas as divisões periclinais. A porção central do cilindro é ocupada por uma medula ainda bem proeminente (Figura 3.1.1).

A raiz em crescimento secundário possui periderme desenvolvida, com grande parte das células periféricas rompidas. Tanto nas células do córtex quanto nas da periderme são observadas células com acúmulo de grãos de amido. Periciclo e endoderme são observados, porém menos evidentes se comparado a raiz em crescimento primário. Entre o floema e o xilema secundário ocorre um câmbio com várias camadas de células em divisão. Internamente ocorrem vários estratos de xilema secundário composto por fibras, elementos de vaso e células parenquimáticas. São observadas placas de perfuração simples. Uma significativa parte da porção central do cilindro vascular é ocupada por xilema primário e medula central (Figura 3.1.2).

O caule, tanto em crescimento primário e secundário, apresenta formato quadrangular em secção transversal. O caule primário apresenta epiderme unisseriada com tricomas glandulares e tectores. A base de alguns desses tricomas é formada por células maiores que as células comuns da epiderme. O número de camadas de colênquima angular varia de cinco a seis. Essa camada pode ser interrompida por um grupo de células parenquimáticas. Segue-se uma faixa de espessura variada de parênquima cortical. O tecido vascular é formado feixes vasculares colaterais. Observa-se quatro feixes maiores nos ângulos, e feixes menores entre eles. O xilema é formado por fileiras radiais de vasos com aproximadamente 4 células, dispostas do centro para a superfície do órgão. Esses grupos são separados por células parenquimáticas relativamente amplas. A medula possui células semelhantes às células parenquimáticas do córtex (Figura 3.1.3).

O caule em crescimento secundário apresenta periderme em estágio inicial. São observadas divisões periclinais camada subepidérmica, entre a epiderme e a camada de colênquima, indicando o início do desenvolvimento do felogênio. A epiderme ainda mantém vestígios de tricomas. Abaixo da periderme encontra-se uma camada contínua de colênquima de três a sete células, seguida de uma camada de semelhante espessura de parênquima cortical. Adiante são visíveis feixes de fibras, mais isolados nas faces planas e mais concentrados, chegando a formar uma camada, nas faces côncavas. O sistema vascular é contínuo, com vários estratos de floema e xilema acompanha o formato externo do caule. Salvo em pequenas ondulações observadas onde os feixes de fibras estão mais separados. A medula possui células parenquimáticas comuns, marcadamente as maiores do órgão (Figura 3.1.4).

A folha possui mesofilo dorsiventral. A epiderme possui tricomas glandulares e tectores nas duas faces, e sobre a nervura central (Figura 3.1.5). Os tricomas glandulares são pedunculados por uma ou mais células e a cabeça é formada por uma ou mais células. O tamanho é diverso, sendo que os maiores possuem pedúnculo reduzido e encontra-se em depressões da epiderme. Os tricomas glandulares menores apresentam pedúnculo mais proeminente e encontram-se no mesmo nível das células comuns da epiderme. Os tricomas tectores apresentam de duas a três células e são de formato afilado, inseridos sobre células epidérmicas maiores do que as adjacentes (Figura 3.2). A epiderme adaxial apresenta com parede externa em formato cônico com ápice arredondado o que confere aspecto sinuoso. Isso é observado em menor grau na face abaxial, que possui células epidérmicas menores. O limbo é anfiestomático, sendo observada uma quantidade maior de estômatos na face abaxial.

O mesofilo possui dois terços de parênquima clorofiliano lacunoso e um terço de paliçádico. O parênquima paliçádico pode ser interrompido por idioblastos, projeções de fibras dos feixes secundários ou projeções da bainha. Existem feixes vasculares de pequeno calibre entre o parênquima lacunoso e o paliçádico. Em todo parênquima ocorrem gotículas de óleo, sendo a maior concentração observada no paliçádico. Idioblastos, com indícios da presença de óleo essencial, podem ser encontrados permeando os parênquimas clorofilianos (Figura 3.3).

A nervura central tem aspecto biconvexo. A face adaxial possui várias camadas de colênquima logo abaixo da epiderme. A face abaxial possui de uma a duas camadas de colênquima. A epiderme das duas faces pode ser interrompida por células maiores, localizadas na base dos tricomas (Figura 3.1.5).

O pecíolo apresenta formato côncavo, interrompido por duas projeções que abrigam cada uma um feixe vascular colateral. A estrutura anatômica do pecíolo caracteriza-se pela presença de epiderme unisseriada, recoberta por cutícula delgada e presença de tricomas tectores e glandulares, semelhantes aos descritos para o limbo. Ocorrem alguns complexos estomáticos acima das demais células epidérmicas, com grandes cavidades estomáticas. Sob a epiderme encontra-se até quatro camadas de colênquima angular. Camadas estas interrompidas nas regiões onde se encontram os estômatos. O feixe vascular principal encontra-se dividido em duas partes, espelhadas, de formato côncavo-convexo. Uma camada pouco desenvolvida de fibras recobre o floema. O sistema vascular é colateral. O córtex é formado por células parenquimáticas grandes e com espaços intercelulares (Figura 3.1.6).

3.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O presente trabalho é um estudo preliminar das características anatômicas e histoquímicas de patchouli a fim de se estabelecer um padrão para identificação correta da espécie. Em trabalhos anteriores Maeda & Miyake (1997) e Noraini et al. (2011) descrevem a estrutura da lâmina foliar de patchouli, entretanto, não há evidências da realização de testes histoquímicos nestes trabalhos, além da falta de descrição anatômica dos demais órgãos vegetativos. Deste modo, nesta discussão são utilizados trabalhos realizados com outras espécies aromáticas pertencentes à família Lamiaceae e ao gênero *Pogostemon* a fim de observar características que possam contribuir para a identificação da espécie.

Ao comparar cortes anatômicos realizados em raízes de *Salvia viridis* e *Salvia blepharoclaena* pode-se observar presença da periderme bem desenvolvida, e medula central composta por xilema primário, semelhantes às encontradas nas plantas de patchouli (ÖZKAN & SOY, 2007; ÖZDEMİR et al., 2009).

O caule de formato quadrangular em secção transversal é bastante característico em Lamiaceae, conforme descrito por Lakušić et al. (2006) e Özdemir et al. (2009). A epiderme unisseriada com presença de tricomas glandulares e não glandulares (STAIL et al., 2002; LAKUŠIĆ et al., 2006; ÖZKAN & SOY, 2007; AKTAS et al., 2009), o colênquima interrompido por células parenquimáticas (STAIL et al., 2002; AKTAS et al., 2009) e a medula composta por células parenquimáticas (AKTAS et al., 2009; ÖZDEMİR et al., 2009; ÖZKAN & SOY, 2007), também estão presentes em outras espécies da família.

O mesofilo dorsiventral é encontrado também em plantas de *Melissa officinalis* e *Ocimum gratissimum*. A presença de células epidérmicas da face abaxial menores em comparação as da face adaxial e o limbo anfiestomático com maior número de estômatos na face abaxial são comuns em *Ocimum gratissimum* e demais espécies do gênero *Cyclotrichium*. Assim como nas espécies do gênero *Cyclotrichium* a proporção 2:1 entre parênquima lacunoso e parênquima paliádico se mantém nas plantas de *Pogostemon cablin* (MARTINS & PASTORI, 2004; MARTINS et al., 2009; STAIL et al., 2011).

Uma característica anatômica que parece diferenciar a espécie estuda das demais pertencentes à família Lamiaceae é a presença de gotículas de óleo essencial visualizadas nos parênquimas clorofilianos. Estudos anatômicos já demonstram a presença de glândulas e reservatórios no espaço subcuticular foliar em Lamiaceae (GERSHENZON et al., 2000). Lersten et al. (2006) discute extensivamente a presença de oleossomos no mesofilo de angiospermas, inclusive em espécies de Lamiaceae. Entretanto, estas estruturas estariam

relacionadas ao acúmulo de triacilgliceróis e ácidos graxos, os quais não são voláteis como terpenos e, portanto não podem ser considerados óleos essenciais. Diferenciando assim, as células de óleos encontradas em patchouli das demais espécies.

Em *Pogostemon cablin* a presença de gotículas de óleos nos parênquimas clorofilianos podem estar relacionadas à presença de células acumuladoras de óleo essencial. Em um trabalho pioneiro na descrição anatômica de folhas de patchouli Henderson (1970) enfatiza a presença de células especializadas em acumular óleo essencial encontradas no mesofilo. Tais células foram visualizadas por Maeda & Miyake (1997) com auxílio de técnicas de microscopia eletrônica, segundo estes autores estas células possuem citoplasma extremamente denso o que dificulta a descrição detalhada destas estruturas. Entretanto, afirmam que o produto secretado por estas células contém terpenos cíclicos que são armazenados no espaço entre a cutícula e a parede celular das células secretoras.

Noraini et al. (2011) também identificou a presença de células internas acumuladoras de óleo essencial em folhas de patchouli sugerindo tal órgão vegetativo como responsável pela maior produção de óleo essencial em toda a planta. Por outro lado, estes autores não descreveram anatomicamente os demais órgãos vegetativos dessa espécie. Em nosso trabalho podemos observar que há presença destas células em outros órgãos vegetativos de patchouli, entretanto, em frequência bastante reduzida quando comparada as folhas. Desse modo, a presença destas estruturas internas somadas a presença de tricomas glandulares faz com que realmente as folhas possam ser consideradas os órgãos vegetativos de maior importância para a produção de óleo essencial em patchouli.

Em espécies de Lamiaceae é descrito a presença de tricomas glandulares e peltados, onde a presença destes pode variar entre as espécies da família (GERSBACH, 2001). Ao estudar a morfologia e a distribuição de tricomas em 13 espécies do gênero *Pogostemon*, Tahair et al. (1995) concluem que tanto a morfologia quanto a distribuição dessas estruturas nos órgãos vegetativos de cada espécie podem ser considerados um caractere taxonômico importante para a identificação das diversas espécies de *Pogostemon*.

Segundo Henderson et al. (1970) em *Pogostemon cablin* estão presentes dois tipos de tricomas, tectores, em maior quantidade, e glandulares presentes em menor quantidade. Podendo a concentração de tricomas nas folhas aumentar em até 10 vezes quando comparado a ramos e pecíolos. A morfologia dos tricomas encontrados no presente trabalho é representada na Figura 3.2 e o padrão de distribuição destas estruturas é representado na Tabela 3.1. Nossos resultados sugerem que a classificação dos tricomas presentes em patchouli possa ir além da distinção entre tricomas glandulares e tectores, sugerimos que o

número de células que estes apresentam também deve ser considerado, podendo-se utilizar este padrão como uma característica taxionômica de identificação para a espécie.

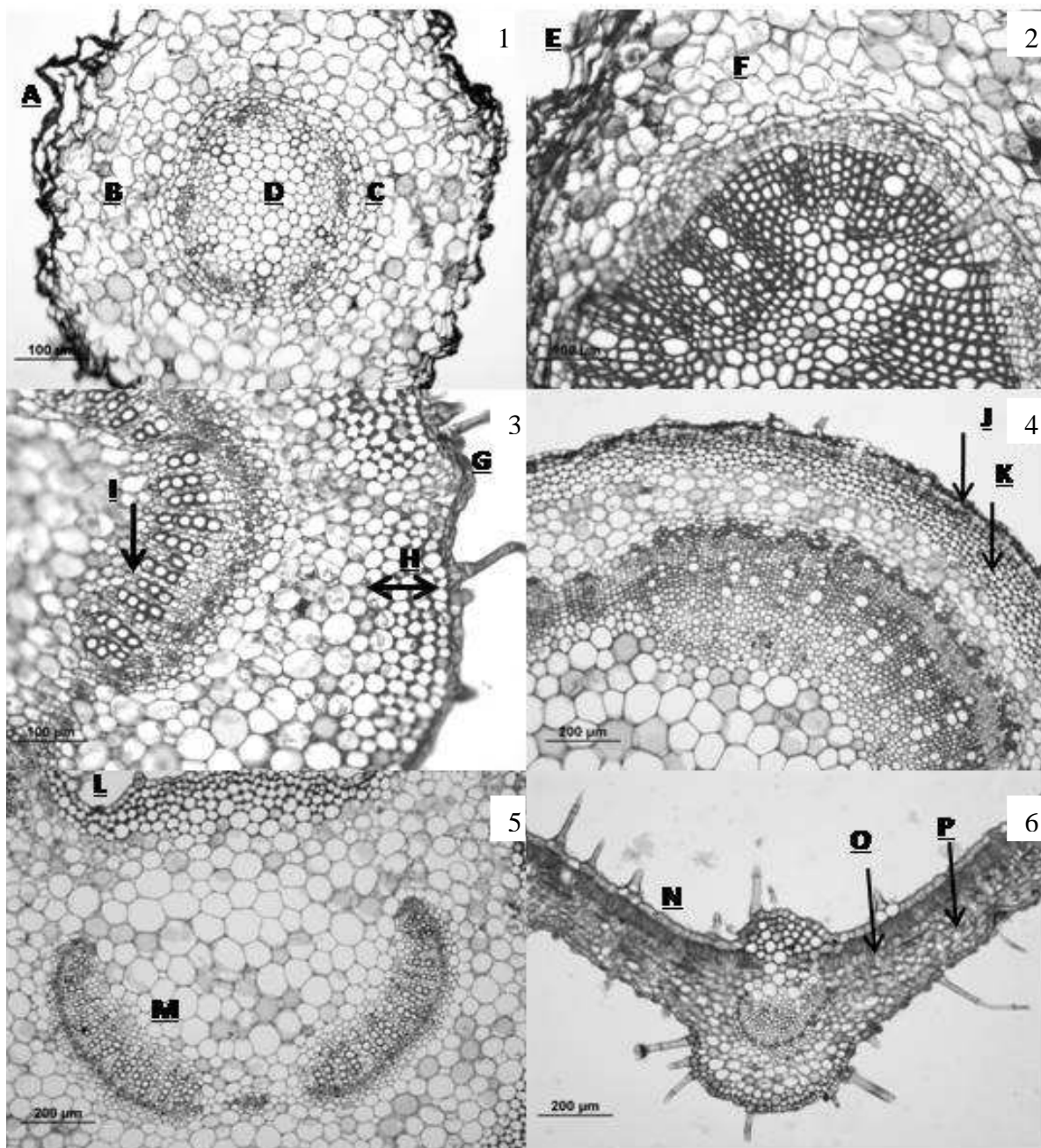


Figura 3. 1 - Raiz de crescimento primário (1) observe a presença da epiderme unisseriada (A), córtex com células parenquimáticas (B), endoderme (C) e cilindro vascular com estrutura pentarca (D). Raiz de crescimento secundário (2) onde E representa a periderme e F o córtex. Caule de crescimento primário (3) com presença de epiderme unisseriada e tricomas (G), colênquima angular com 5-6 camadas de células (H) e xilema em fileiras radiais de quatro células (I). Caule de crescimento secundário (4) as setas indicam periderme inicial (J) e colênquima (K). Pecíolo (5) epiderme unisseriada (L) e sistema vascular colateral (M). Lâmina foliar (6) observe a epiderme unisseriada com presença de tricomas (N), parênquima paliçádico clorofiliano (O) e parênquima lacunoso (P).

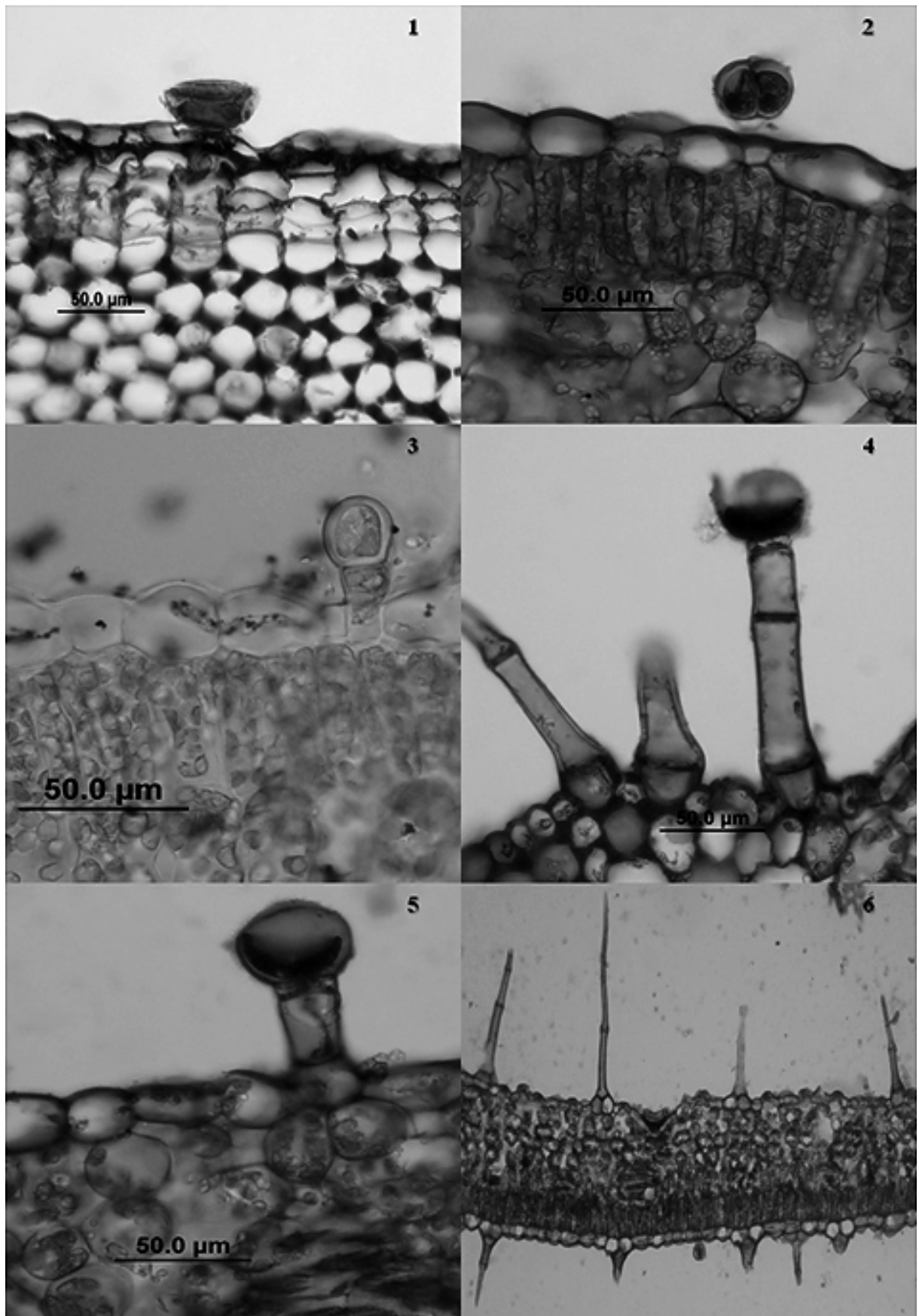


Figura 3. 2 – Observe a presença de tricoma glandular unicelular com pedúnculo reduzido (1), tricoma glandular

com duas células e pedúnculo reduzido (2), tricoma glandular pedunculado e com duas células (3), tricoma glandular pedunculado unicelular (4 e 5) e tricomas tectores contendo de 2 a 3 células (6).

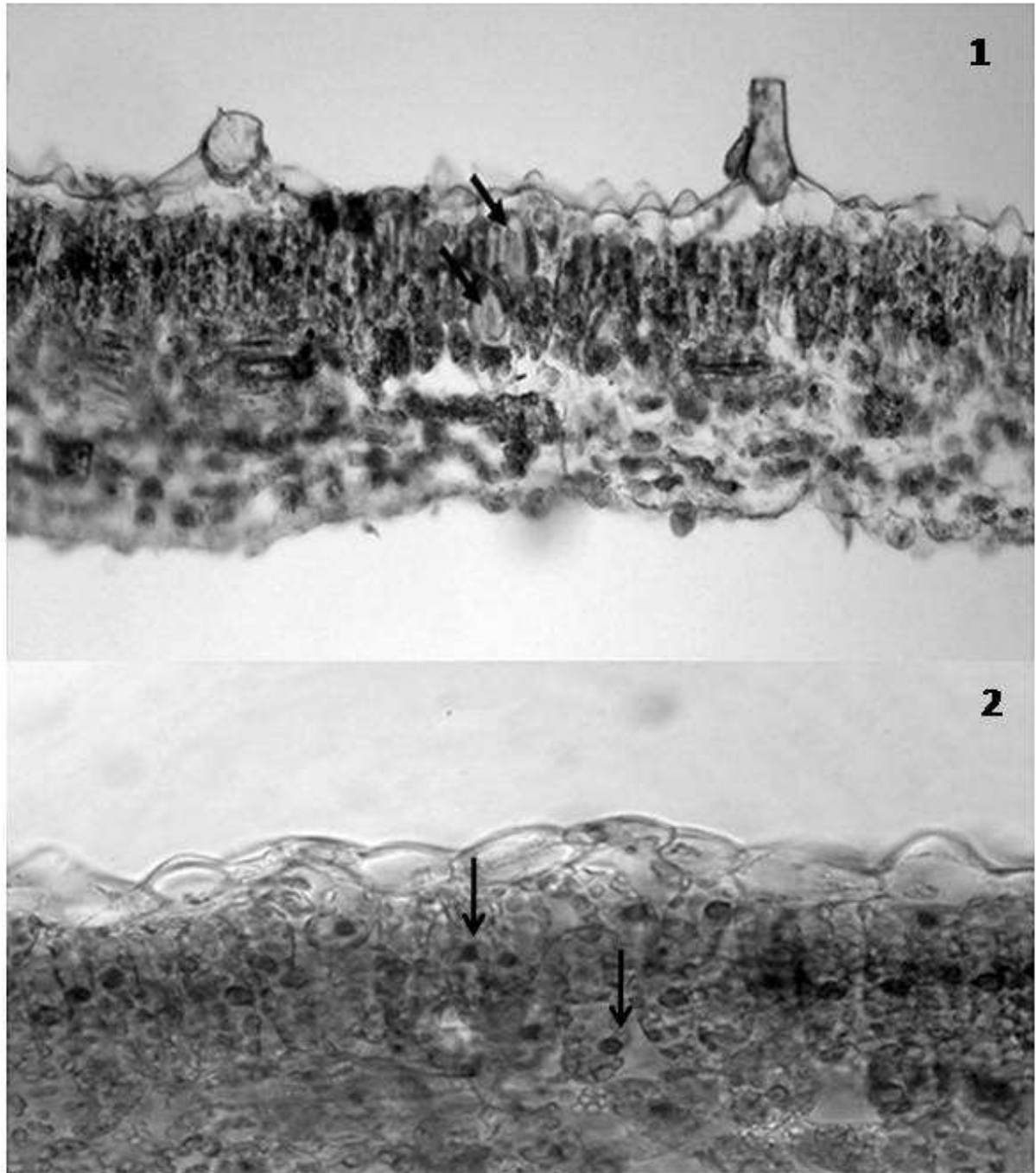


Figura 3. 3- Aspecto geral da secção transversal da lâmina foliar de patchouli. As setas (1) indicam a presença de idioblastos contendo substâncias lipídicas, evidenciadas pela reação com Sudan III. Detalhe das células do parênquima clorofiliano paliádico (2), as setas indicam a presença de gotículas de óleo essencial permeando o parênquima.

Tabela 3. 1 – Distribuição de Tricomas Glandulares e Tectores, células oleíferas e idioblastos nos diferentes órgãos vegetativos de patchouli.

	Tricomas Glandulares						Células	
	Pedunculado		Pedúnculo Reduzido		Tricomas Tectores		Oleíferas	Idioblastos
	1 Célula	2 Células	1 Célula	2 Células	2 Células	3 Células		
Raiz	-	-	-	-	-	-	+	-
Caule	+	+	+	+	++	++	+	-
Folha	+	+	+	+	++	++	++	+
Pecíolo	+	+	+	+	++	++	+	-

Os sinais (-) representam a ausência de tricomas nos órgãos vegetativos, (+) presença de tricomas e (++) presença de maior densidade de tricomas.

A análise dos testes histoquímicos é apresentada na Tabela 3.2, onde é possível observar a presença de grãos de amido nas raízes, folhas e pecíolos de patchouli evidenciados pela reação com lugol. A presença de lignina pode ser observada pela reação com cloreto férrico e floroglucina nas raízes, folhas, pecíolos e mais fortemente nos caules. A presença de substâncias lipídicas se mostrou positiva para raízes, caules e fortemente positiva nas folhas e pecíolos, com bases nas colorações observadas após testes com sudan III e IV e sudan black B.

Tabela 3. 2 – Testes histoquímicos realizados nos diferentes órgãos vegetativos de patchouli.

Corante	Composto Marcado	Coloração Observada	Órgão Vegetativo Observado			
			Raíz	Caule	Folha	Pecíolo
Lugol	Amido		+	-	+	+
Cloreto Férrico e Floroglucina	Lignina	Rosa	+	++	+	+
Sudan III e IV	Lipídeos	Alaranjado	+	+	++	++
Sudan Black B	Lipídeos	Preto	+	+	++	++

Os sinais representam (-) ausência de coloração, (+) coloração positiva e (++) coloração fortemente positiva.

3.5. CONCLUSÕES

A presença de gotículas de óleo essencial no parênquima clorofiliano paliçádido pode ser utilizada para diferenciar *Pogostemon cablin* das demais espécies da família Lamiaceae.

Há presença de células contendo óleo essencial nos demais órgãos vegetativos. Entretanto, a maior densidade é observada na lâmina foliar.

Na lâmina foliar de patchouli estão presentes idioblastos os quais possuem evidências de conter óleo essencial.

3.6. REFERÊNCIAS

AKTAS, K.; ÖZDEMİR, C.; ÖZKAN, M.; AKYOL, Y.; BARAN, P. Morphological and anatomical characteristics of *Salvia tchihatcheffii* endemic to Turkey. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 18, p. 4519-4528, 2009.

GERLACH, D. **Botanische Microtechnik**. Stuttgart: Georg Thieme, 1984.

GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v. 89, p.255-260, 2001.

GERSHENZON, J.; McCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 122, p. 205-213, 2000.

GUBAREVA, L.V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Research**. v. 103, p. 199-203, 2004.

HENDERSON, W.; JAMES, W.H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, Egham, v. 9, p. 1219-1228, 1970.

HSU, H. C.; YANG, W. C.; TSAI, W. J.; CHEN, C.C.; HUANG, H. Y.; TSAI, Y. C. a-Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 345, p.1033–1038, 2006.

JENSEN, W.A. **Botanical Histochemistry: Principle and Practice**. W.H. Freeman, San Francisco, 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique** . New York: McGraw-Hill, 1940

KISO, M.; MITAMURA, K.; SAKAI-TAGAWA, Y.; SHIRAISHI, K.; KAWAKAMI, C.; KIMURA, K.; HAYDEN, F.G.; SUGAYA, N.; KAWAOKA, Y. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: Descriptive study. **Lancet**. v. 364, p.759-765, 2004.

KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y.; NAGAI, T.; SATO, N.; YAMADA, H. Patchouli alcohol: In vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. **Journal of Natural Medicine**, 2011.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR. 25p. 1997.

LAKUŠIĆ, B.; LAKUŠIĆ, D.; LANČIĆ, R.; STEVANOVIĆ, B. Morpho-anatomical differentiation of the Balkan populations of the species *Teucrium flavum* L. (Lamiaceae). **Flora**. v. 201, p. 108-119, 2006.

LERSTEN, N. R.; CZLAPINSKI, A. R.; CURTIS, J. D.; FRECKMANN, R.; HORNER, H. T. Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: Overview and select survey. **American Journal of Botany**. v. 93, n. 12, p. 1731-1739, 2006.

MAEDA, E.; MIYAKE, H. Leaf anatomy of patchouli (*Pogostemon patchouli*) with reference to the disposition of mesophyll glands. **Japanese Journal of Crop Science**. v. 66, n. 2, p. 307-317, 1997.

MARTINS, J.R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SILVA, A. P. O., OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**. v.39, n.1, p.82-87, 2009.

MARTINS, M.B.G; PASTORI, A. P. Anatomia foliar com ênfase nos tricomas secretores e análise cromatográfica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.6, n.2, p. 77-82, 2004.

MIYAZAWA, M.; Y. OKUNO, Y.; S.-I. NAKAMURA, S.I.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.3, p. 642–647, 2000.

ÖZDEMİR, C.; BARAN, P.; AKTAS, K. Anatomical studies in *Salvia viridis* L. (Lamiaceae). **Bangladesh Journal Plant Taxonomy**. v.16, n.1, p. 65-71, 2009.

ÖZKAN, M.; SOY, E. Morphology, anatomy, hair and karyotype structure of *Salvia blepharoclaena* Hedge and Hub.-Mor. (Lamiaceae) endemic to Turkey. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 16, p. 893-898, 2007.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n.6, p. 3-21, 2001.

SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Beth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, p. 101-107, 2002.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Sistemática Botânica. Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 639 p., 2005.

STAIL, F.; TÜMEN, G.; AKÇELİK, A.; HÜSNÜ, K.; BAŞER, C. Comparative morphological, anatomical, ecological and chemical studies on endemic *Satureja parnassica* subs. *sipylea* from Turkey. **Acta Botanica Croatica**. v. 61, n. 2, p. 207-220, 2002.

STAIL, F.; KAYA, A.; DIRMENCI, T. The taxonomic value of leaf anatomy and trichome morphology of genus *Cyclotrichium* (Lamiaceae) in Turkey. **Nordic Journal of Botany**. v. 28, p. 38-48, 2011.

THAIR, S. S.; KHANAM, M.; HUSAIN, S. Z. A micromorphological study of *Pogostemon* species (Lamiaceae) from Bangladesh. **Pakistan Journal of Botany**. v. 27, n. 1, p. 73-82, 1995.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

WU, Y.G., GUO, Q.S., ZHENG, H.Q. Studies on residuals of organochlorine pesticides and heavy metals in soil of planting base and *Pogostemon cablin*. **China Journal Chinese Materia Medica**. v. 33, p. 1528–1532, 2008.

WU, H.; LI, B.; WANG, X.; JIN, M.; WANG, G. Inhibitory Effect and Possible Mechanism of Action of Patchouli Alcohol against Influenza A (H2N2) Virus. **Molecules**. v. 16, p. 6489-6501, 2011.

4. CAPÍTULO III - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI EM TEORES DECRESCENTE DE UMIDADE DO SOLO

RESUMO

Pogostemon cablin Benth., popularmente conhecido como patchouli, possui óleo essencial amplamente utilizado pelas indústrias de cosméticos e de perfumarias devido à fragrância amadeirada e capacidade de fixação à pele conferida pelo constituinte patchoulol. Vários fatores ambientais, entre eles a disponibilidade hídrica, afetam a produção de óleos essenciais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de teores decrescentes de umidade do substrato no crescimento e produção de óleo essencial de patchouli. As mudas foram obtidas por estaquia e transferidas para vasos em casa de vegetação após 30 dias, aonde foram mantidas até o término do experimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 com quatro repetições, cada qual com quatro vasos contendo uma planta. Após 88 dias do plantio, as mudas tiveram a irrigação suspensa ou mantida, sendo avaliadas após 3, 6, 9, 12 e 15 dias, totalizando cinco períodos de avaliação. As plantas que receberam irrigação apresentaram maiores médias de altura, número de folhas e massa seca de folhas e ramos em relação às plantas não irrigadas após 15 dias. O teor e a produtividade do óleo essencial por sua vez foram inferiores em plantas não irrigadas. A disponibilidade hídrica não afetou a maioria dos constituintes químicos do óleo essencial, sendo observado apenas aumento na concentração de cariofileno em plantas não irrigadas. Os constituintes delta-elemenol, germacreno-D, acifileno, delta-guaieno e patchoulol apresentaram variação nos seus teores durante os períodos de avaliação, porém não foram decorrentes da disponibilidade hídrica do solo.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin* Benth., Patchoulol, Irrigação.

GROWTH AND PRODUCTION OF PATCHOULI ESSENTIAL OIL UNDER DIFFERENT LEVELS OF SOIL MOISTURE

ABSTRACT

Pogostemon cablin Benth., popularly known as patchouli, has essential oil widely used by the cosmetics and perfumes industries due to woody fragrance and skin-fixing ability conferred by the patchoulol constituent. Several environmental factors including water availability affect the essential oils production. This study aims to evaluate the influence of different soil moisture levels on growth and yield of patchouli essential oil. Scions were produced by cuttings and transferred to greenhouse pots after 30 days, where they were held until the experiment final. The experimental design was completely randomized in a 2x5 factorial with four replications, each one with four pots with one plant. After eighty-eight days of planting, the plants had the watering suspended or maintained and evaluated after three, six, nine, twelve, and fifteen days totaling five evaluation periods. The plants that received irrigation had higher average height, number of leaves, leaves dry weight, and branches than plants not irrigated after fifteen days. The content and yield of essential oil in turn were lower than in the non-irrigated plants after twelve days. The water availability did not affect the majority of the chemical constituents of essential oil, finding only the concentration increasing of caryophyllene in non-irrigated plants. Delta-elemene, germacrene-D, acifilene, delta-guaiene, and patchoulol constituent showed variation in their levels during the evaluation period, but they were not due to soil water availability.

Keywords: *Pogostemon cablin* Benth., Patchoulol, Irrigation.

4.1.INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são considerados metabólitos secundários com grande importância econômica, principalmente no que diz respeito à indústria alimentícia e farmacêutica (PIMENTEL et al., 2006). O patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.), pertence à família Lamiaceae e possui óleo essencial rico em terpenos com ampla utilização nas indústrias de cosméticos e de perfumarias, devido à sua fragrância amadeirada e capacidade de fixação à pele (SUGIMURA et al., 2005; ZHAO et al., 2005). Os principais constituintes do óleo essencial do patchouli são: patchoulol, alfa-bulneseno, alfa-guaieno, gama-patchouleno entre outros sesquiterpenos (SILVA et al., 2004; DEGUERRY et al., 2006). Dentre estes constituintes, o patchoulol é considerado o mais importante, sendo seu percentual utilizado como parâmetro para definir a qualidade do óleo essencial do patchouli. Segundo a International Standard Organization o óleo essencial do patchouli deve atender as características descritas pela ISO (3757:2002), a qual determina a presença dos seguintes constituintes no óleo essencial desta espécie: beta-patchouleno (1,8% - 3,5%); copaeno (traços - 1%); alfa-guaieno (11% - 16%); beta-cariofileno (2% - 5%); bulneseno (13% - 21%); nor-patchoulol (0,35% - 1%); patchoulol (27% - 35%); gama-patchouleno (1,8% - 3,5%); pogostol (1% - 2,5%).

A deficiência hídrica não limita apenas o crescimento e a sobrevivência do vegetal, mas induz também nestes várias respostas fisiológicas e metabólicas (SANGWAN et al., 2001). O metabolismo secundário vegetal e seus metabólitos são resultado de respostas e adaptações a diferentes estresses ambientais durante todo um processo de evolução. Deste modo, a biossíntese de metabólitos secundários, está fortemente relacionada às condições do ambiente no qual o vegetal está inserido, incluindo suas respostas aos fatores bióticos e abióticos (LIXIA & XIUFENGLI, 2007).

Entre os fatores que alteram a produtividade de espécies, o estresse relacionado a condições ambientais é o mais limitante, pois pode afetar todas as funções metabólicas do vegetal. Em plantas de *Thymus vulgaris*, ao comparar-se o efeito de intervalos de irrigação (3, 5, 7 e 10 dias), EMAN et al. (2008) observaram que plantas irrigadas em intervalos de 3 dias tiveram maior altura, massa fresca e seca por planta quando comparadas aos demais tratamentos.

Trabalhos anteriores com espécies aromáticas têm demonstrado que o regime hídrico ao qual uma planta é submetida pode alterar não apenas o teor como também a composição do óleo essencial. Conforme observado em *Rosmarinus officinalis* L. (SOLINAS et al., 1996) e

Melaleuca alternifolia Cheel. (SILVA et al., 2002), a deficiência hídrica resultou em decréscimo na produção do óleo essencial. Em plantas de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e cominho (*Carum carvi* L.) tanto o excesso de irrigação, quanto o déficit hídrico reduziram os teores de óleos essenciais (LARIBI et al., 2009; PIZARD et al., 2006). Por outro lado, *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum americanum* L. apresentaram maiores porcentagens de óleos essenciais bem como alterações na composição. Os constituintes canfeno, seбенeno, 1,8-cineol, linalol, metil-chavicol, geraniol e cânfora, foram superiores para as duas espécies. Entretanto, além destes constituintes houve acréscimo nos teores de germacreno-D e geranil isso-butirato para *Ocimum basilicum* L. e de terpineol, farneseno, beta-bisaboleno e eugenol para *Ocimum americanum* L. no óleo essencial quando submetidos ao estresse hídrico (KHALID, 2006).

Em gerânio (*Pelargonium capitatum* x *P. radens*) EIASU et al. (2009) observaram que o déficit hídrico reduziu aproximadamente de 20 a 40% do teor do óleo essencial, entretanto, não alterou sua composição.

O patchouli, devido ao hábito de crescimento perene, está sujeito a variações na disponibilidade hídrica durante seu cultivo. Apesar da importância comercial do óleo essencial desta espécie, as possíveis consequências da redução da disponibilidade hídrica no crescimento e na produção de óleo essencial da espécie, e da colheita após períodos de precipitação não foram avaliados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia de diferentes teores de umidade do substrato no crescimento e sua relação com alterações no teor, produtividade e composição, do óleo essencial de patchouli.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As mudas de patchouli foram obtidas por estaquia (6 cm de comprimento com um par de folhas reduzidas a metade) em casa de vegetação e após 30 dias foram transferidas para vasos (17cm de altura e 23 cm de diâmetro) com capacidade para aproximadamente 6 Kg de substrato.

Como substrato foi utilizado solo, o qual foi analisado no Departamento de Solos da Universidade Federal do Paraná, apresentando as seguintes características: CaCl_2 4,5; SMP 5,0; Al^{+3} 1,7 (cmol_c/dm³); $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$ 10,50 (cmol_c/dm³); Ca^{+2} 3,5 (cmol_c/dm³); Mg^{+2} 1,9 (cmol_c/dm³); K^+ 0,07 (cmol_c/dm³); SB 5,47 (cmol_c/dm³); T 15,97 (cmol_c/dm³); P 3,9 (mg/dm³); C 43,8 (g/dm³); V 34(%); m 24 (%); Ca/Mg 1,8 e argila 525(g/Kg).

Para alcançar o nível de saturação de bases do solo, foi incorporado 9,9 toneladas.ha⁻¹ de CaCO₃ (100 % PNRT) (RAIJ et al., 1996). Ainda de acordo com estes autores, foi incorporado 30Kg.ha⁻¹ de N, 60 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 110 Kg.ha⁻¹ de K₂O. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 com 4 repetições, cada qual com 4 vasos com uma planta (Figura 4.1).

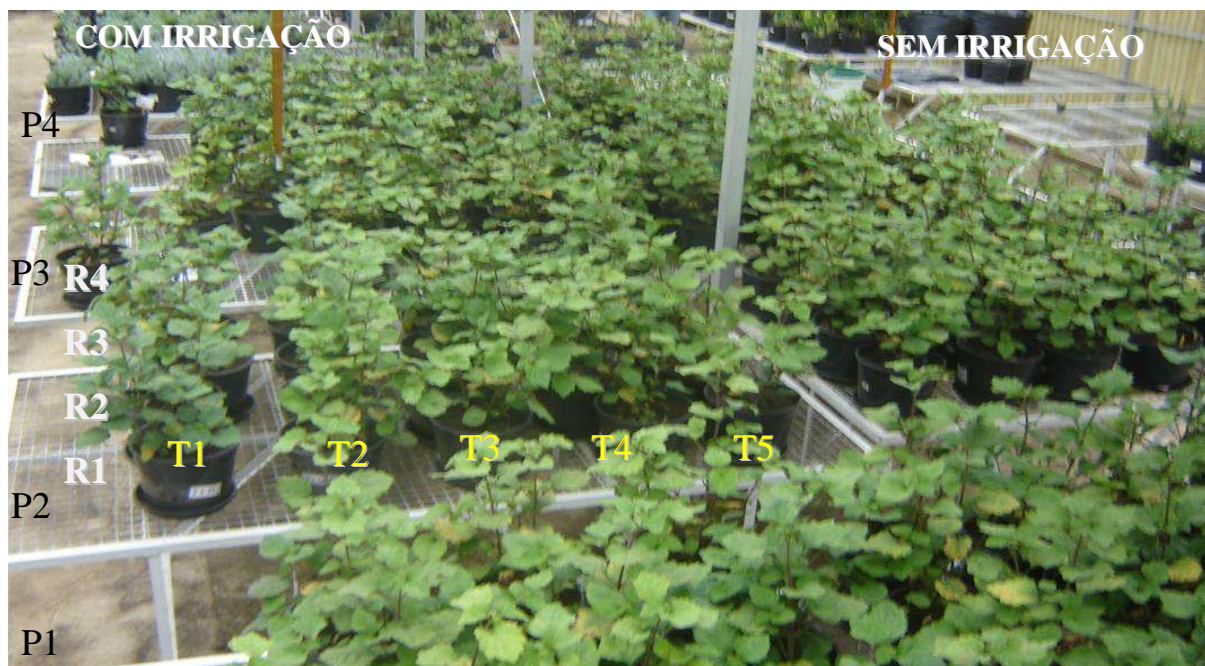


Figura 4. 1 - Distribuição das plantas em casa-de-vegetação divididas em dois grupos (com e sem irrigação). Observe os cinco tempos de avaliação do experimento representados por “T”. A letra “R” indica as repetições dos tratamentos e a letra “P” representa as quatro plantas que compõem cada repetição.

Após 88 dias do plantio, as mudas tiveram a irrigação suspensa ou mantida (irrigação com 200 mL de água diariamente), sendo avaliadas após 3, 6, 9, 12 e 15 dias (Figura 4.2).

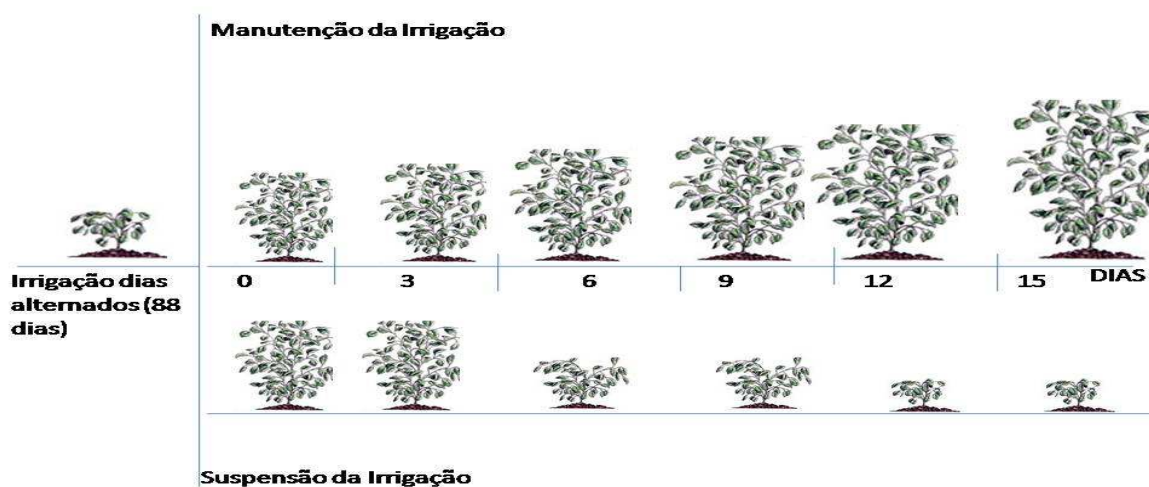


Figura 4. 2 - Observe o esquema de condução do experimento. Do momento do plantio das mudas até completarem 88 dias as plantas recebem irrigação em dias alternados (200 mL de água). Após este período o primeiro grupo de plantas é irrigado diariamente e o segundo grupo de plantas tem suspensão total da irrigação.

Os dias 0; 3; 6; 9; 12 e 15 representam os 5 períodos de avaliação do experimento e o total de dias em que as plantas permaneceram nestas condições.

Em cada período de avaliação, foram retiradas amostras do substrato (solo) de cada tratamento, que foram devidamente pesados e levados à estufa (65°C) (Estufa de secagem e esterilização FANEM modelo 320-SE, com circulação de ar mecânica) aonde foram mantidos até atingir peso constante para determinar o nível de umidade do substrato (Figura 4.3).

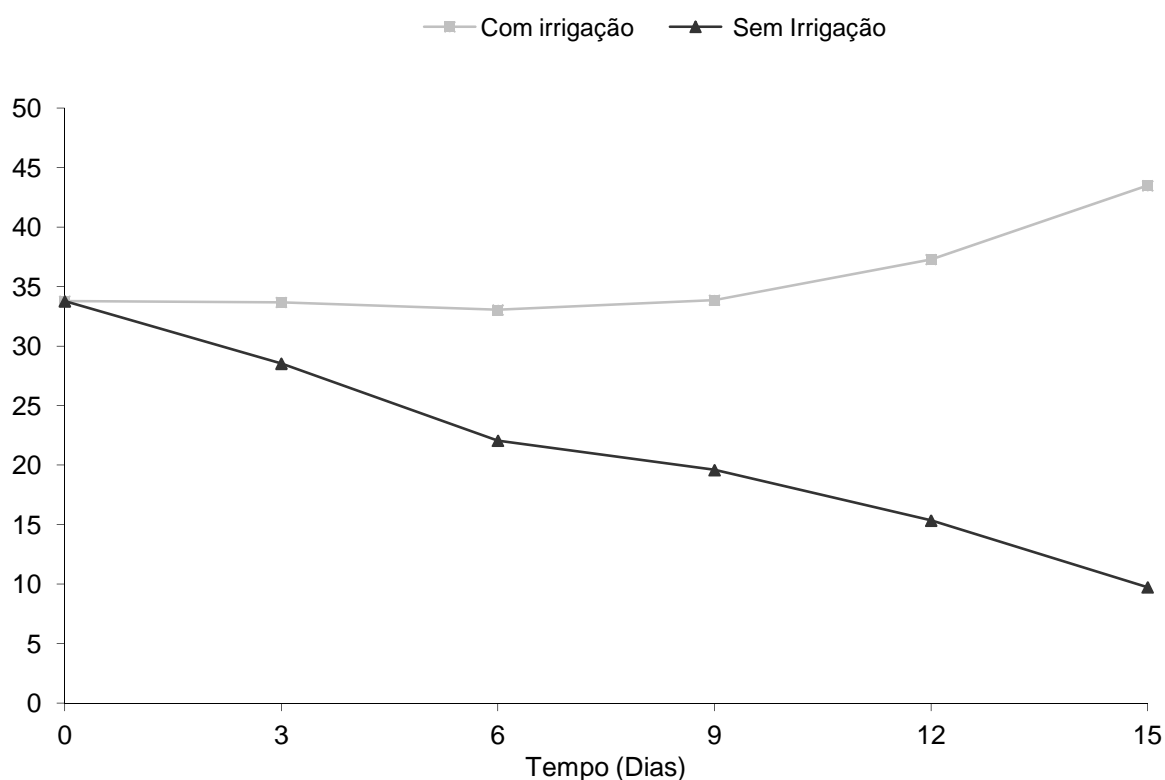


Figura 4. 3 - Porcentagem de umidade do substrato nos diferentes períodos de avaliação do experimento em condições de manutenção e suspensão da irrigação.

O crescimento das mudas foi avaliado por meio da determinação da área foliar (Fernandes, 2000), altura (cm) e número de folhas e de ramos. Para a determinação da massa seca de folhas e de ramos, o material vegetal foi mantido em estufa FANEM modelo 320-SE com circulação de ar forçado durante cinco dias até atingir peso constante.

Para a extração do óleo essencial utilizou-se 30g tecido foliar com aproximadamente 20% de umidade após secagem durante 3 dias à sombra para hidrodestilação durante 5 horas em aparelho graduado Clevenger com balão volumétrico de 2L. O volume de cada amostra foi determinado com auxílio de micropipetas e corrigido para base seca. As amostras do óleo essencial foram analisadas por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a

espectrometria de massa (CG/EM), realizada em sistema Agilent 5973N, equipado com uma coluna capilar de sílica HP-5MS (5%-difetil-95%-dimetilsilicone, 30m X 0,25mm X 0,25µm). Utilizando-se gás carreador hélio (1,0 mL/min). O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70eV), com o analisador de massas mantido a 150°C, a fonte de ionização a 220°C e a linha de transferência a 260°C.

As análises de variâncias foram realizadas com auxílio do programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas or regressão polinomial e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p>0,05$).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo do nível de umidade do solo no crescimento de patchouli durante o período de avaliação do experimento (Figura 4.4). As plantas em que a irrigação foi mantida apresentaram maiores médias de altura e número de folhas, demonstrando que houve crescimento nestas condições de umidade do solo durante o período de avaliação. O mesmo não foi observado em plantas não irrigadas, aonde houve aumento na altura até o 12º dia e número de folhas até o 9º dia de tratamento com diminuição das médias após estes períodos. Segundo LARIBI et al. (2009) o déficit hídrico afeta todos os parâmetros de crescimento de plantas de cominho (*Carum carvi* L.), demonstrando que quanto mais severo o déficit hídrico maior a redução do desenvolvimento vegetativo dessa espécie.

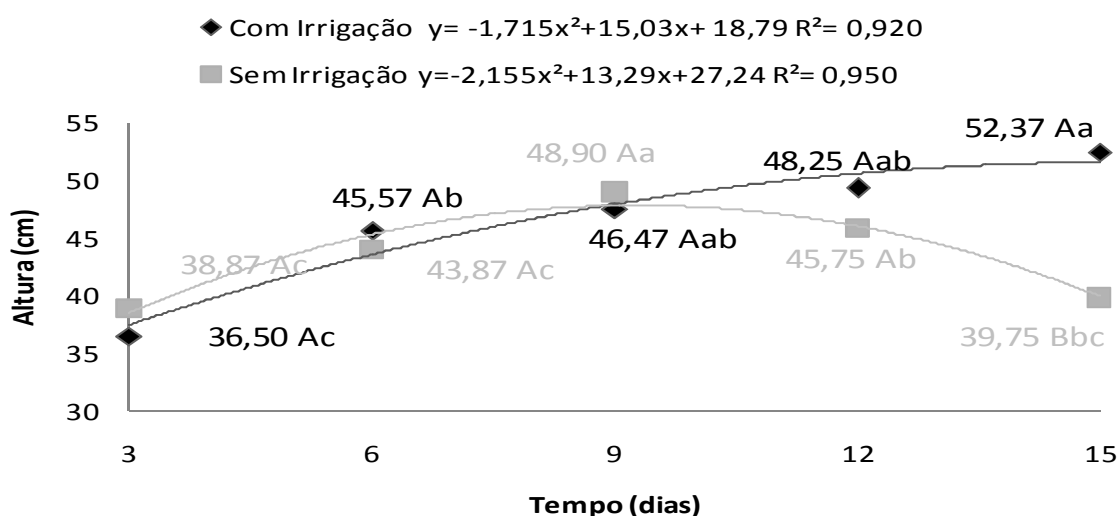


Figura 4. 4 – Altura (cm) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre

os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O decréscimo no número de folhas foi observado ao 12º dia, onde o tratamento não irrigado apresentou média inferior a observada no mesmo período no tratamento onde a irrigação das plantas foi mantida (Figura 4.5).

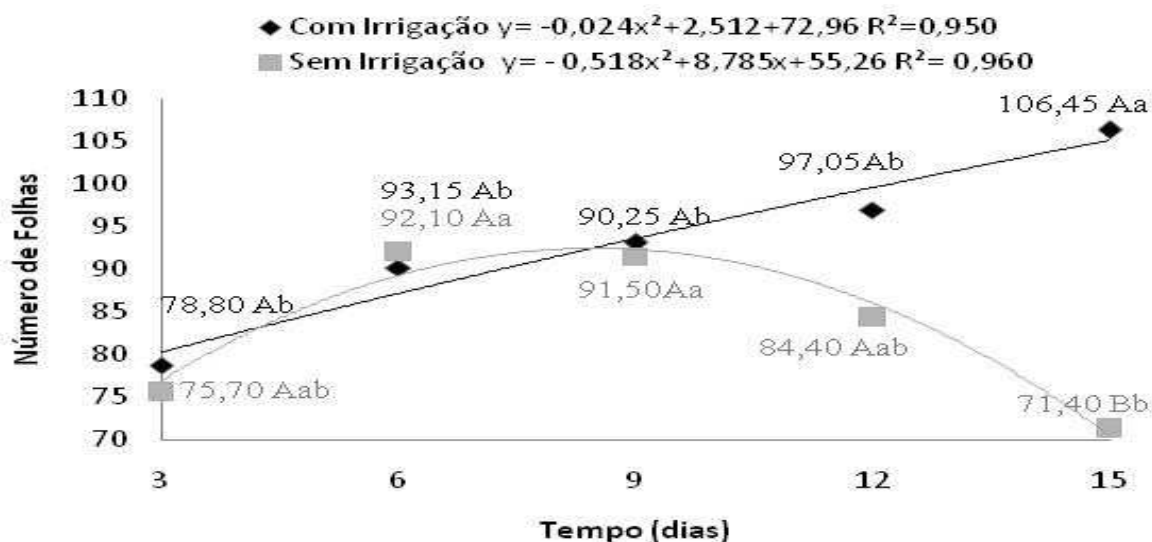


Figura 4. 5 – Número de folhas das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à área foliar foi possível observar que com excessão do 3º dia, os tratamentos irrigados apresentaram médias superiores quando comparadas aos mesmos períodos de avaliações dos tratamentos não irrigados. Ao longo do tempo, foi possível observar que a irrigação constante das plantas favoreceu o aumento da área foliar com maiores médias aos 15 dias de avaliação. Por outro lado, a suspensão da irrigação reduziu a área foliar, onde as menores médias foram observadas ao final do último período de avaliação (Figura 4.6). Comparando-se os tratamentos com e sem irrigação, em *Melaleuca alternifolia* Cheel., diferentes regimes hídricos (irrigação em dias alternados, irrigação diária, lâmina de 1cm de água e lâmina de 15cm de água) não alteraram a área foliar das plantas (SILVA et al., 2002). Deste modo, os resultados encontrados neste experimento não concordam com os autores acima citados, e demonstram que a disponibilidade hídrica altera a área foliar e o desenvolvimento vegetativo das plantas de patchouli.

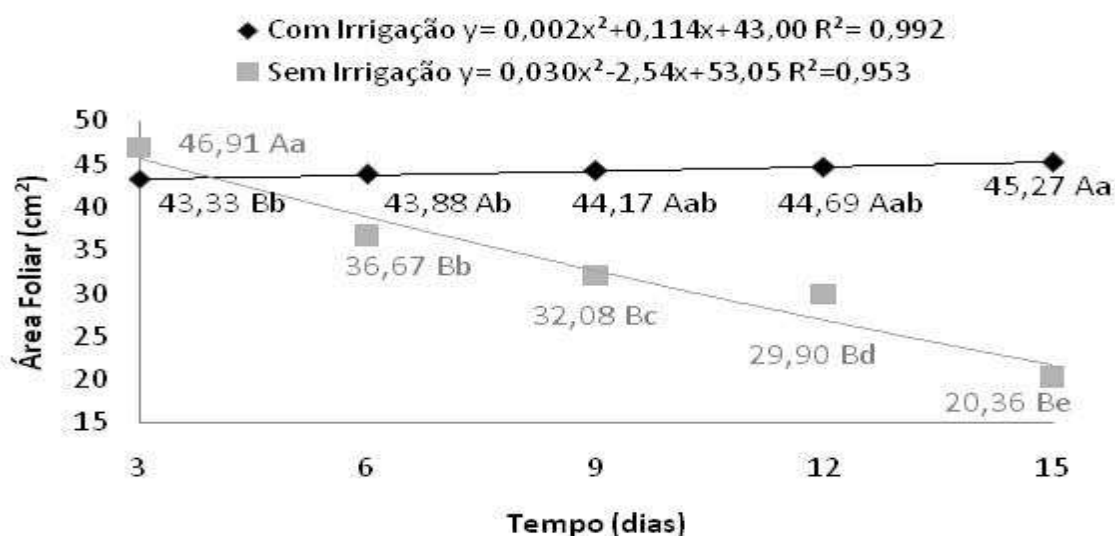


Figura 4. 6 – Área foliar (cm²) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à massa seca de folhas pode-se observar que nos tratamentos irrigados houve aumento das médias durante o período de avaliação devido ao aumento do número de folhas. Por outro lado, plantas que tiveram suspensão de irrigação apresentaram acréscimo de massa seca de folhas apenas até o 9º dia de avaliação. Após este período houve uma drástica redução nos teores de massa seca foliar, o que estaria relacionado com a abscisão foliar observada nesses tratamentos durante os períodos de avaliação e conseqüente diminuição do número de folhas (Figura 4.7).

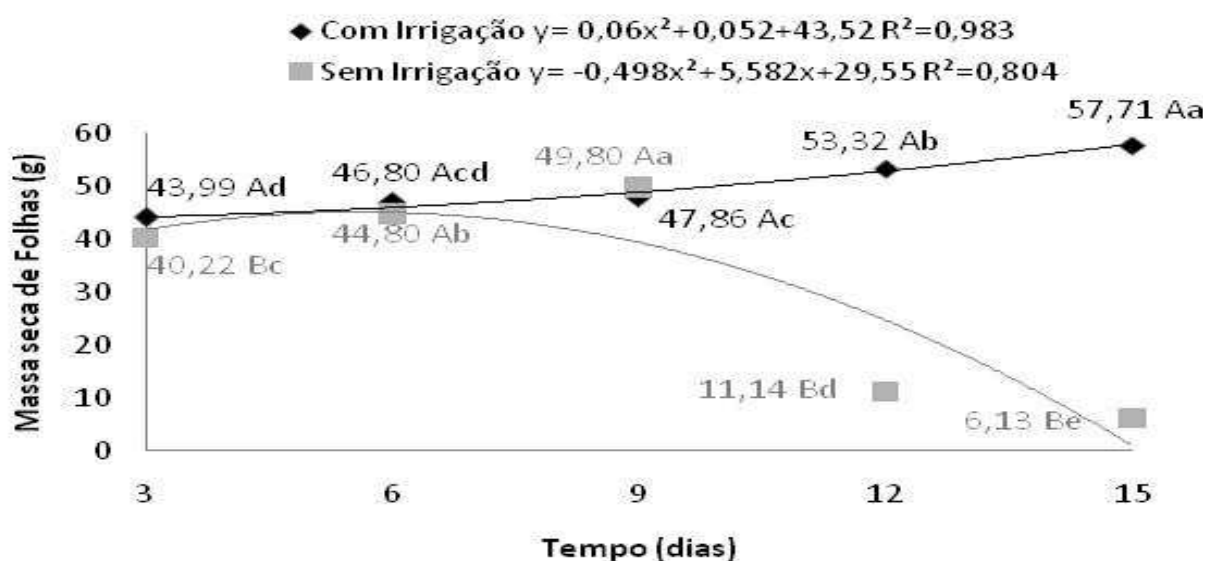


Figura 4. 7 – Massa seca de folhas (g) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve aumento das médias de massa seca de ramos nos tratamentos irrigados ao longo dos 15 dias de avaliação. Entretanto, nos tratamentos com suspensão de irrigação houve aumento da massa seca de ramos até o 12º dia de avaliação, havendo redução após este período. Em relação a massa seca de ramos, houve diferença estatística entre os níveis de umidade do solo aos 15 dias, onde o tratamento não irrigado teve massa seca menor quando comparado ao mesmo período sem suspensão de irrigação (Figura 4.8). Como não houve diferença significativa entre as médias de número de ramos entre plantas irrigadas e não irrigadas, pode-se concluir que a disponibilidade afetou apenas o crescimento de ramos durante o período de avaliação (Figura 4.9).

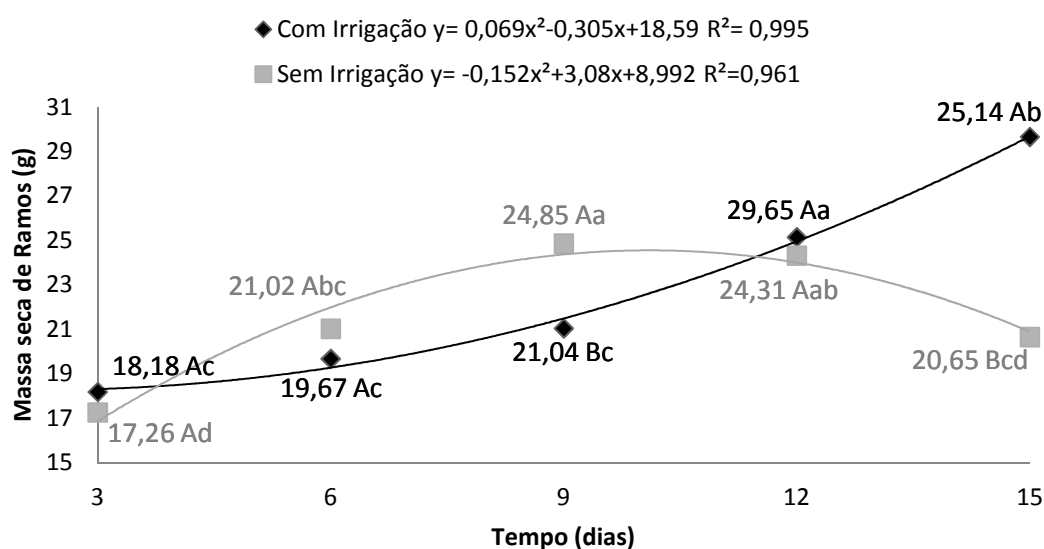


Figura 4. 8 – Massa seca de ramos (g) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

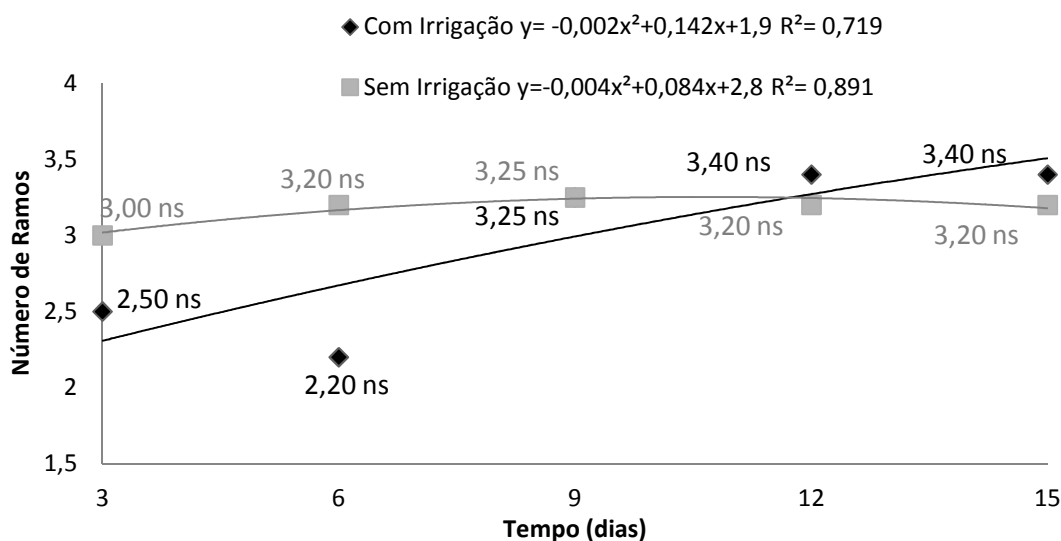


Figura 4. 9 – Número de ramos das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o teor de óleo essencial foi possível observar que plantas mantidas sob irrigação constante apresentaram uma tendência a aumentar os teores ao longo de todos os períodos de avaliação. De forma contrária, plantas com suspensão total de irrigação além de apresentarem sempre teores inferiores de óleo essencial quando comparadas ao mesmo período de avaliação em plantas constantemente irrigadas, apresentaram uma drástica redução dos teores ao quanto mais tempo foram mantidas nestas condições (Figura 4.10).

O maior teor de óleo essencial encontrado após 15 dias em plantas irrigadas constantemente pode estar relacionado à maior massa seca de folhas das plantas nessas condições, pois segundo HENDERSON et al. (1970), as estruturas de síntese e armazenamento de óleo essencial em patchouli estão presentes em maior quantidades nas folhas. De forma semelhante, os tratamentos com suspensão de irrigação, aos 12 e aos 15 dias de avaliação, apresentaram menores teores de óleo essencial, o que pode estar relacionado à diminuição do número de folhas, área foliar e massa seca de folhas nesta condição.

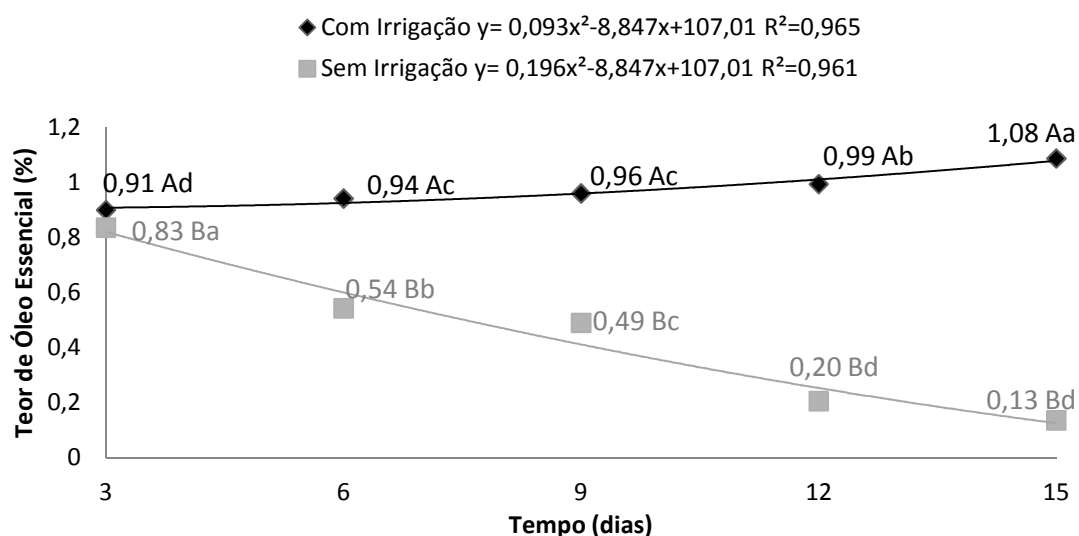


Figura 4. 10 – Teor de óleo essencial (%) das plantas de patchouli mantidas em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise cromatográfica revelou a presença dos seguintes constituintes na composição do óleo essencial de patchouli: delta-elemeno, beta-patchouleno, beta-elemeno, cycloseycheleno, alfa-guaieno+seycheleno, alfa-patchouleno, germacreno-d, acifileno, delta-guaieno, nor-patchoulol, cariofileno e patchoulol. Embora não houve interação significativa entre os fatores para a composição do óleo essencial, os fatores afetaram de forma isolada a porcentagem de alguns constituintes do óleo essencial (Tabela 4.1). Durante os períodos de avaliação, os constituintes alfa-patchouleno, beta-patchouleno, nor-patchoulol, beta-elemeno, cycloseycheleno e alfa-guaieno+seycheleno não tiveram seus percentuais significativamente alterados. De forma contrária, os constituintes delta-elemeno, germacreno-D, acifileno, delta-guaieno, cariofileno e patchoulol apresentaram flutuações, o que pode estar relacionado à menor estabilidade química destes constituintes no óleo essencial.

A disponibilidade hídrica afetou apenas o percentual do composto cariofileno, o qual foi superior estatisticamente em condições de menor disponibilidade hídrica. Com relação aos demais constituintes, principalmente o constituinte majoritário patchoulol, não houve efeito deste fator.

Os componentes do óleo essencial do patchouli são formados a partir do farnesil-difosfato que sofre alterações estruturais dando origem a dois intermediários humulil cátion e E,E – germacradienil cátion, este último é o responsável pela síntese do patchoulol e demais constituintes do óleo. O humulil cátion dá origem aos compostos alfa-humuleno e trans-beta-cariofileno. A síntese destes compostos ocorre por meio de um desvio da rota anterior a

formação do composto E,E – germacradienil cátion, e desta forma compete na formação de outros compostos do óleo essencial (DEGUERRY et al., 2006). Portanto, a maior concentração do composto cariofileno nos tratamentos não irrigados pode indicar que a manutenção destas plantas por um período de tempo superior a 15 dias sem irrigação pode resultar na diminuição dos outros compostos do óleo essencial de patchouli.

Tabela 4. 1 - Composição do óleo essencial de patchouli em diferentes períodos e níveis de umidade do substrato.

Constituintes	Tempo (Dias)					Irrigação	
	3	6	9	12	15	Com	Sem
Delta - Elemene	0.10a	0.04b	0.04b	0.08ab	0.04b	0.05ns	0.06ns
Germacrene-D	0.23a	0.16b	0.18ab	0.24a	0.21ab	0.22ns	0.19ns
Acifilene	1.78a	1.36b	1.58ab	1.60ab	1.44ab	1.58ns	1.52ns
Delta-Guaiene	11.23a	8.54b	9.92ab	9.96ab	9.05b	9.98ns	9.51ns
Caryophyllene	0.15bc	0.09c	0.18abc	0.23ab	0.28a	0.14b	0.23a
Patchoulol	60.13b	68.57a	63.08ab	61.86ab	64.26ab	63.38ns	63.78ns
Alpha-Patchoulene	3.35ns	2.71ns	3.22ns	3.18ns	3.29ns	3.12ns	3.12ns
Beta-Patchoulene	1.11ns	0.98ns	1.06ns	1.11ns	1.27ns	1.09ns	1.12ns
Nor-Patchoulene	1.07ns	1.06ns	0.96ns	1.03ns	1.08ns	1.03ns	1.05ns
Beta-Elemene	0.56ns	0.42ns	0.51ns	0.44ns	0.40ns	0.46ns	0.48ns
Cicloseychelene	0.31ns	0.22ns	0.31ns	0.31ns	0.28ns	0.30ns	0.28ns
Alpha-Guaiene+Seychelen	11.63ns	9.21ns	10.94ns	11.02ns	10.08ns	10.77ns	10.39ns

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo

4.4.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que nos períodos de avaliação tanto o crescimento como o teor de óleo essencial de patchouli é drasticamente afetado pela disponibilidade hídrica e que a composição do óleo essencial mantém-se praticamente inalterada em função deste fator nas condições do experimento.

4.5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 1999.

CASTRO, H.G. de; OLIVEIRA, L.O. de; BARBOSA, L.C. de A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. da; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-87, 2004.

DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, n. 2, p. 123-136, 2006.

ELIAS, B. K.; STEYN, J. M.; SOUNDY, P. Rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum* X *P. radens*) growth and essential oil yield response to different soil water depletion regimes **Agricultural Water Management**, v. 96, n. 6, p. 991–1000, 2009.

FAROOQI, A. H. A; SANGWAN, N. S.; SANGWAN. R. S. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation** v.29, n. 3, p 181-187, 1999.

FERNANDES, P. D. Análise de crescimento e desenvolvimento vegetal. Campina Grande: UFPB, Departamento de Engenharia Agrícola, 2000. 22p.

HENDERSON, W.; JAMES, W. H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, n.6, p. 1219-1228, 1970.

ISO 3757:2002(E). **Oil of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Beth.]**. International Standard Organization. 6p.

LARIBI, B.; BETTAIEB, I.; KOUKIA, K.; SAHLIA, A.; MOUGUA, A.; MARZOUK, B. Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 372–379, 2009.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

PIZARD, A.; ALYARI, M. R.; ZHELAB-SALMASI, S.; MOHAMMADI, A. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. **Journal of Agronomy**, v. 5, n. 3, p. 451-455, 2006.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n.6, p. 3-21, 2001.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: **American Society of Agricultural Engineers**, Orlando, p.393-396, 2006.

SILVA, M. A. S.; EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composition and chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Pogostemon patchouli* pellet leaves. **Acta Horticulturae**, n. 629, p. 145-147, 2004.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L.C. A.; *et al.*, Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SOLINAS, V. S.; GESSA, D.C.; BAZZONI, A.; LODDO, M.A.; SATTA, D. Effects of water and nutritional conditions on *Rosmarinus officinalis* L. phenolic fraction and essential oil yield. **Revista Italiana Eppos**, v. 19, p. 189-198, 1996.

SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 82, n.3, p.251–257, 2005.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

ZHI-LIN, Y; CHUAN-CHAO, D; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 1266-1271, 2007.

5. CAPÍTULO IV - ASPECTOS ANATÔMICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DE PATCHOULI EM DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE DO SOLO

RESUMO

O patchouli é uma espécie aromática pertencente à família Lamiaceae e possui importância econômica devido ao óleo essencial que produz. O nível de umidade do substrato ao qual uma planta é submetida altera suas características bioquímicas, fisiológicas e anatômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar como estas características podem ser afetadas pelo suprimento hídrico do substrato no qual as plantas de patchouli se desenvolvem. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X5, com 4 repetições, cada qual com quatro vasos contendo uma planta. Dois níveis de suprimento hídrico (plantas irrigadas constantemente e ausência total de irrigação) e 5 períodos de avaliação (3, 6, 9, 12 e 15 dias) após o início dos regimes de irrigação foram comparados. Os tratamentos (com ou sem irrigação) iniciaram-se aos 88 dias após o plantio. Os teores de açúcares solúveis totais e redutores, proteínas solúveis totais, aminoácidos, clorofilas e carotenóides foram determinados. Parâmetros de troca gasosa (temperatura foliar, resistência estomática e transpiração), além da anatomia dos tecidos da epiderme e do parênquima também foram determinados. Foi observado que a restrição hídrica promove aumento nas concentrações de açúcares solúveis totais e aminoácidos e diminui as concentrações de açúcares redutores, proteínas solúveis totais e pigmentos fotossintetizantes. Além alterar estruturas celulares do tecido foliar.

Palavras - chave: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; espécie aromática; suprimento hídrico.

ANATOMICAL, BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF PATCHOULI AT DIFFERENT LEVELS OF SOIL MOISTURE

ABSTRACT

The patchouli is an aromatic species belonging to the family Lamiaceae and has economic importance due to the essential oil it produces. The moisture level of the substrate to which a plant is submitted alter its biochemical characteristics, physiological and anatomical. The objective of this study was to evaluate how these characteristics could be affected by the water supply of the substrate in which the patchouli plants develop. The experiment was conducted in a greenhouse in a completely randomized design in factorial 2X5 with 4 replications with four pots with one plant. Two levels of water supply (plants constantly irrigated and total absence of irrigation), and 5 periods (3, 6, 9, 12 and 15 days) after the beginning of the irrigation.. The treatments (with and without irrigation) started at 88 days after planting. The levels of total soluble and reducing sugars, total soluble proteins, amino acids, chlorophyll and carotenoids were determined Gas exchange parameters (leaf temperature, stomatal conductance and transpiration) were evaluated as well as the anatomy of the epidermis and parenchyma tissues. It was observed that the water restriction increased the total soluble sugars and amino acid concentrations and decreased the levels of reducing sugars, total soluble protein and photosynthetic pigments, besides of changing the cellular structures of the leaf tissues.

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; aromatic species; water supply.

5.1. INTRODUÇÃO

Pogostemon cablin (Blanco) Benth. popularmente conhecido como patchouli é uma espécie aromática pertencente à família Lamiaceae. Possui hábito perene e seu comprimento pode variar entre 0,6 a 1,0m de altura. Em geral se desenvolve bem em ambientes semi-sombreados e em temperaturas entre 24 e 28°C, possui exigência por solos corrigidos e bem supridos de nutrientes. Seu cultivo é recomendado em áreas com precipitação pluviométrica acima de 2000 mm anuais (EPAGRI, 2004).

O óleo essencial produzido pelo patchouli é rico em terpenos sendo amplamente utilizado por indústrias de perfumarias, cosméticos e higiene, fazendo com que esse óleo tenha grande valor comercial (HSU et al., 2006; SUGIMURA et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

As alterações bioquímicas e anatômicas em plantas medicinais decorrentes do ambiente onde estas estão inseridas, devem ser avaliadas uma vez que estas podem afetar diretamente a biossíntese de óleos essenciais.

Metabólitos são produtos finais do metabolismo celular, e são importantes indicadores de como sistemas biológicos respondem à alterações do ambiente (FIEHN, 2002). A síntese de alguns metabólitos é altamente modificada em função da desidratação (LIU et al., 2007).

As respostas das células ao estresse incluem também, alterações no padrão de divisão celular, estrutura da parede celular e produção de compostos osmorreguladores tais como prolina e glicina betaína. O estresse hídrico causado pela seca desenvolve-se de maneira gradual. A expansão celular, síntese da parede celular e síntese protéica estão entre os processos mais sensíveis ao déficit hídrico (LARCHER, 2006; SADRAS & MILROY, 1996; TAIZ & ZEIGER, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de teores decrescentes de umidade do substrato sobre aspectos, bioquímicos, anatômicos e fisiológicos de patchouli.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em condições de casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná – Curitiba – Paraná.

As mudas de patchouli foram obtidas por estaquia (6 cm de comprimento com um par de folhas com metade da área foliar) e após 30 dias foram transferidas para vasos (17cm de altura e 23 cm de diâmetro) com capacidade para aproximadamente 6 Kg de substrato.

Como substrato foi utilizado solo, o qual foi analisado no Departamento de Solos da Universidade Federal do Paraná, apresentando as seguintes características: CaCl_2 4,5; SMP 5,0; Al^{+3} 1,7 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$ 10,50 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); Ca^{+2} 3,5 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); Mg^{+2} 1,9 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); K^+ 0,07 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); SB 5,47 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); T 15,97 ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$); P 3,9 (mg/dm^3); C 43,8 (g/dm^3); V 34(%); m 24 (%); Ca/Mg 1,8 e argila 525(g/Kg).

Para a correção do pH do solo, foi incorporado 9,9 toneladas.ha⁻¹ de CaCO_3 (100 % PNRT) (RAIJ et al., 1996). Ainda de acordo com estes autores, foi incorporado 30Kg.ha⁻¹ de N, 60 Kg.ha⁻¹ de P_2O_5 e 110 Kg.ha⁻¹ de K_2O .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (suspensão ou manutenção da irrigação; cinco períodos de avaliação) com 4 repetições, cada qual com 4 vasos com 1 planta. Após 88 dias do plantio, as mudas tiveram a irrigação suspensa ou mantida, sendo avaliadas após 3, 6, 9, 12 e 15 dias (Figuras 4.1 e 4.2). Em cada período de avaliação, foram retiradas amostras do substrato (solo) de cada tratamento, que foram devidamente pesados e levados à estufa (65°C) (Estufa de secagem e esterilização FANEM modelo 320-SE, com circulação de ar mecânica) aonde foram mantidos até atingir peso constante para determinar o nível de umidade do substrato (Figura 5.1). Durante o período de avaliação do experimento também foram monitoradas a umidade relativa do ar e a luminosidade no interior da casa de vegetação utilizando-se porômetro “Steady State” da marca Li-Cor modelo 1600 (Figura 5.2).

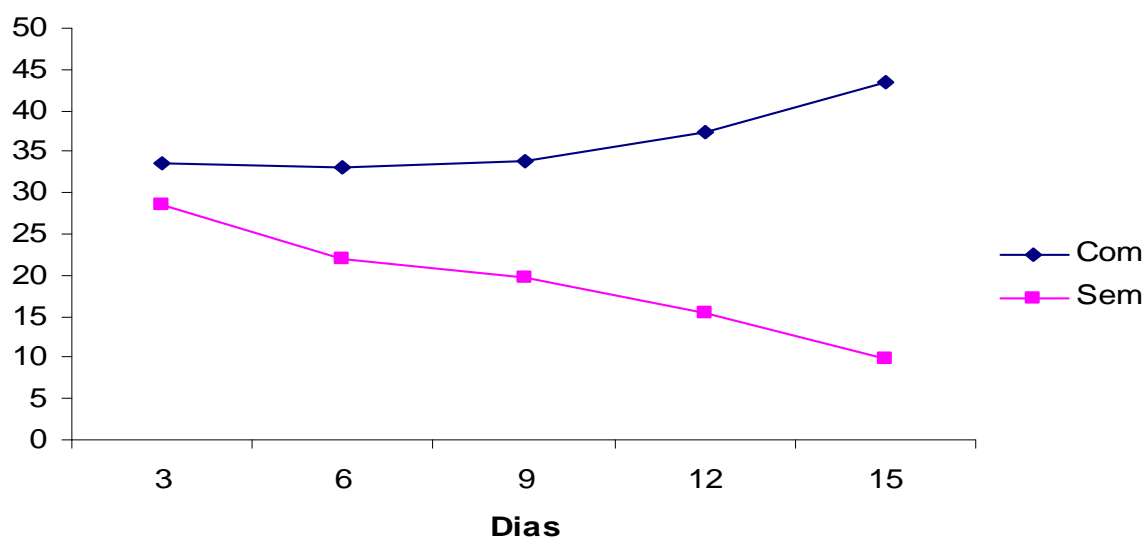


Figura 5. 1 - Umidade do substrato em condições de irrigação e suspensão de irrigação durante os períodos de avaliação do experimento.

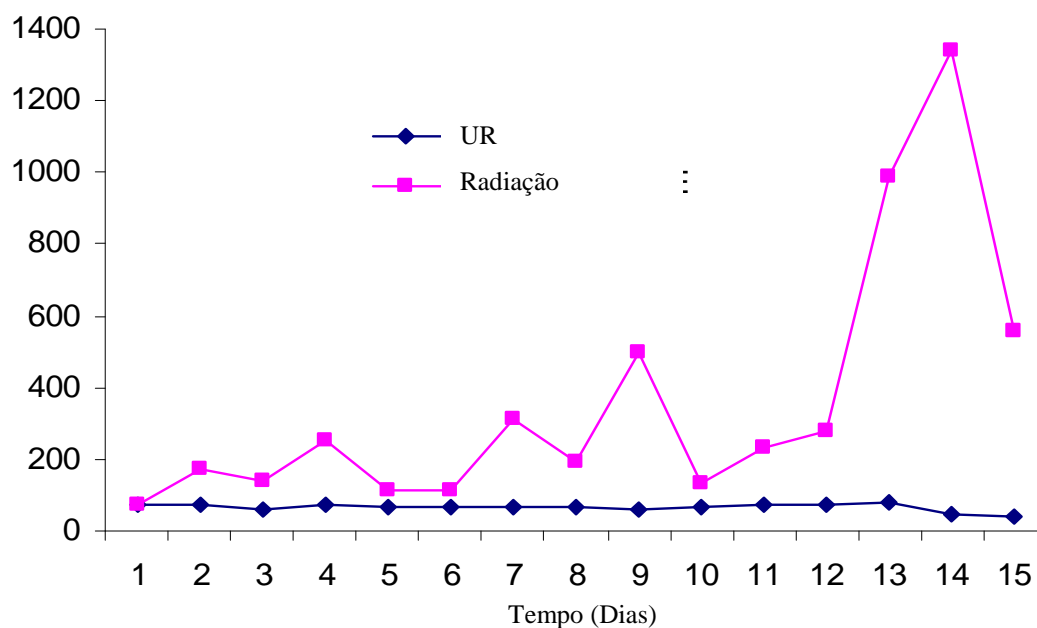


Figura 5. 2 – Umidade relativa do ar (UR) e radiação ($\mu \text{ mol. s}^{-1}. \text{ m}^{-2}$) no interior da casa de vegetação durante o período de avaliação do experimento.

As análises bioquímicas dos tecidos foliares de patchouli foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia no departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Os teores de proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976), aminoácidos solúveis totais (BATES, 1973), açúcares solúveis totais (DUBOIS et al., 1956) e açúcares redutores (MILLER, 1959) foram

determinados a partir de curva padrão e leitura em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601. Os teores de pigmentos fotossintetizantes foram determinados a partir das equações descritas por Lichtenthaler (1987). Para cada determinação utilizou-se 500 mg de material vegetal fresco extraído da região central do quarto par de folhas totalmente expandidas.

A temperatura foliar, resistência estomática, transpiração e foram determinadas utilizando-se um porômetro “Steady State” da marca Li-Cor modelo 1600. As medições foram realizadas sempre às 12 horas, em folhas apicais, medianas e basais de três plantas de cada uma das quatro repetições, sendo realizadas três leituras para cada folha avaliada.

A análise anatômica foi realizada no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. As amostras retiradas do terço mediano central das lamina foliares foram incluídas e emblocadas em Historesin Leica, seguindo as instruções do fabricante. Secções transversais de 10 μ m foram confeccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2145) e coradas com azul de Toluidina (O'BRIEN et al., 1964). Confeccionou-se três laminas semi-permanentes para cada repetição dos tratamentos. As medições de espessura da epiderme na face abaxial e adaxial e parênquima paliçádico e lacunoso foram realizadas em câmara clara, observando três lâminas por repetição e quatro medições em cada lamina. As observações e fotomicrografias para descrição anatômica foram realizadas em câmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX51.

As análises de variâncias foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas por regressão polinomial e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os fatores tempo de cultivo e nível de umidade do substrato para todas as variáveis analisadas.

Para os teores de proteínas solúveis totais foi possível observar que em plantas constantemente irrigadas há uma tendência de aumento nas concentrações ao longo dos períodos de avaliação. De forma contrária, em plantas com suspensão total da irrigação é possível observar uma tendência ao decréscimo das concentrações destas macromoléculas ao longo dos períodos de avaliação (Figura 5.3).

Resultados semelhantes foram obtidos por Lechinoski et al. (2008) para *Tectona grandis* L. onde plantas não irrigadas apresentaram redução dos teores de proteínas solúveis totais. Muitas proteínas envolvidas em respostas ao estresse são enzimas que sintetizam compostos com atividades osmoprotetoras incluindo prolina, poliaminas, glicina betaína e açúcares solúveis (UDOMCHALOTHOR et al., 2009). Deste modo a redução nas concentrações de proteínas seria resultado do aumento da atividade de enzimas proteolíticas, as quais atuariam quebrando proteínas de reserva, e da própria diminuição da síntese protéica, uma vez que a deficiência hídrica afeta todos os processos metabólicos vegetais.

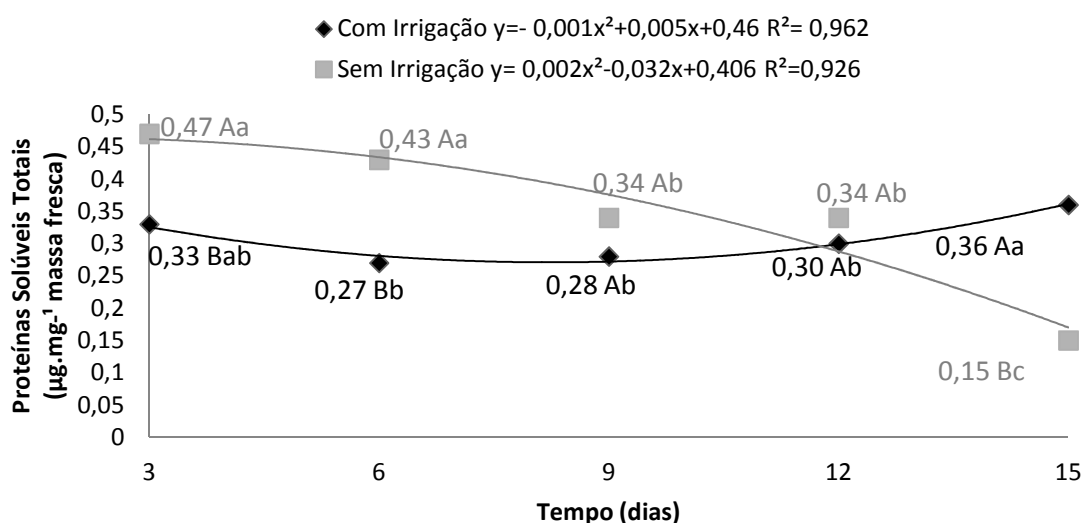


Figura 5. 3 – Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os teores de aminoácidos totais foi possível observar ao longo do tempo que tanto para os tratamentos com suprimento hídrico, quanto para os tratamentos com restrição hídrica as maiores médias foram encontradas no 15º dia. Entretanto, ao comparar-se o efeito da irrigação e da não irrigação aos 15 dias de avaliação, os tratamentos com restrição hídrica tiveram médias superiores (Figura 5.4).

O aminoácido prolina ocorre naturalmente em espécies vegetais. Entretanto, sabe-se que em condições de estresse abióticos este é amplamente acumulado. O acúmulo de prolina em condições de estresse está relacionado a mecanismos de defesa antioxidantes frente a espécies reativas de oxigênio (KHEDR et al., 2003; MOLINARI et al., 2007; OKUMA et al., 2004).

Os dados obtidos para plantas de patchouli sugerem que o aumento da concentração de aminoácidos totais em decorrência da deficiência hídrica seja resultado do acúmulo de prolina no tecido foliar. Resultados semelhantes foram obtidos por Maia et al. (2007) e Costa et al. (2008), onde estes autores relataram aumento das concentrações de aminoácidos totais em plantas submetidas a condições de deficiência hídrica.

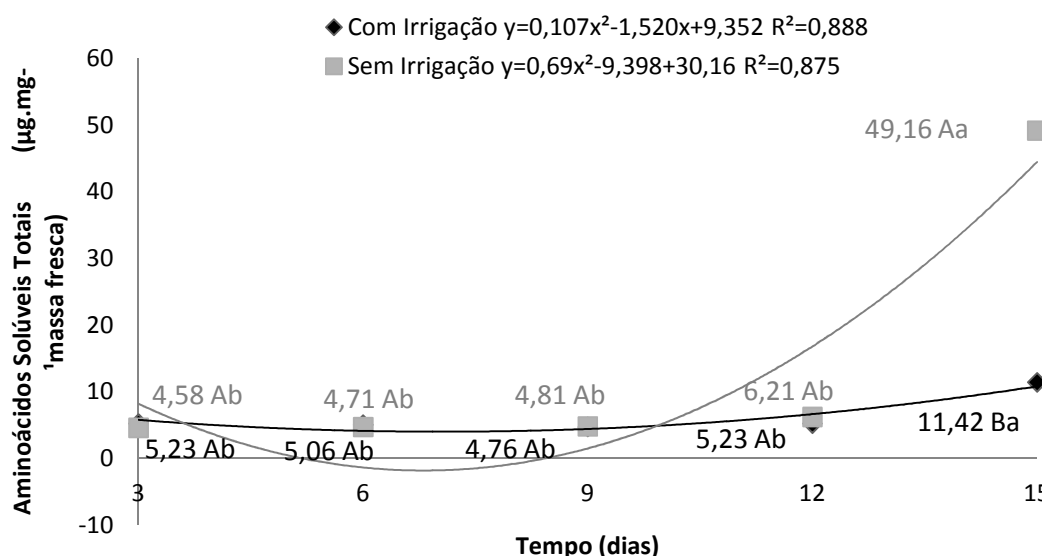


Figura 5. 4 - Concentração de aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os teores de açúcares solúveis totais foi possível observar uma tendência de aumento das concentrações ao longo dos períodos de avaliação. Principalmente no que diz respeito às plantas mantidas sob restrição hídrica, as quais, de um modo geral, apresentaram concentrações superiores às plantas constantemente irrigadas quando comparados os mesmos períodos de avaliação (Figura 5.5).

O aumento nas concentrações de açúcares solúveis totais em plantas mantidas sob deficiência hídrica pode ser explicada devido ao fato de que em condições de estresse e associado à desidratação dos tecidos vegetais, ocorre o decréscimo das concentrações de amido no interior das células, assim como o declínio da capacidade fotossintética. Reduzindo deste modo, o crescimento celular e aumentando a concentração de açúcares totais nos tecidos (VASSEY & SHARKEY, 1989). Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de *Vigna uguiculata* (L.) por Costa et al. (2008). Onde se verificou que a manutenção das plantas sob restrição hídrica promoveu aumento nas concentrações de açúcares solúveis totais.

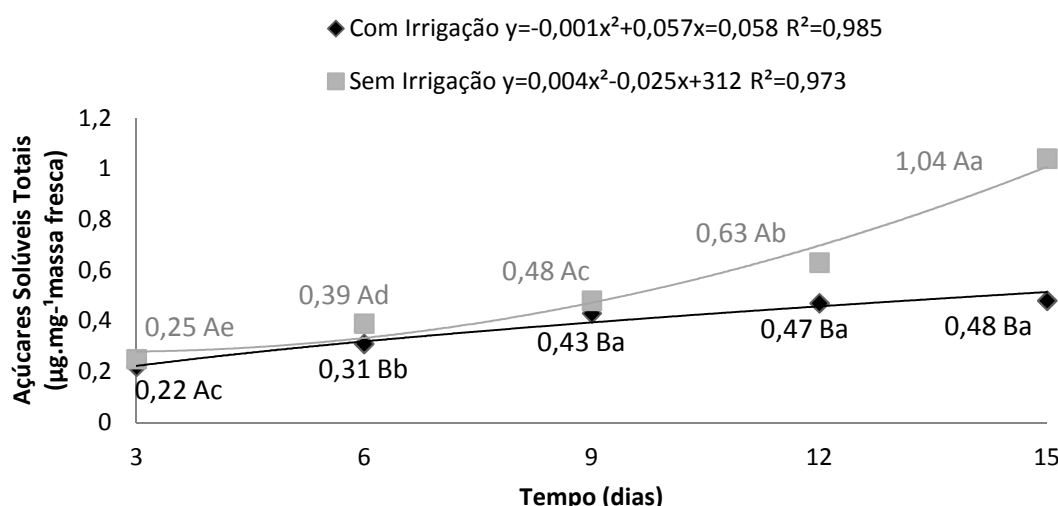


Figura 5. 5 - Concentração de açúcares solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De forma contrária aos teores de açúcares solúveis totais, as concentrações de açúcares redutores tendem a decrescer ao longo dos períodos de avaliação em plantas mantidas em condições de restrição hídrica. Por outro lado, em plantas constantemente irrigadas, há uma tendência de aumento das concentrações destas macromoléculas até os 9 dias de avaliação. Após este período ocorre decréscimo das concentrações. Contudo, os teores observados em plantas constantemente irrigadas foram superiores às plantas não irrigadas nos mesmos períodos de avaliação (Figura 5.6).

Metabólitos são produtos finais do metabolismo celular, e são importantes indicadores de como sistemas biológicos respondem às alterações do ambiente (FIEHN, 2002). Liu et al (2007) observaram em plantas *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim., que as concentrações de alguns metabólitos são altamente modificadas em função da desidratação. As concentrações de sacarose nos tecidos foliares tendem a aumentar logo quando as plantas são submetidas à seca e se mantêm altas até o final deste período. Entretanto, as concentrações de glicose tendem a decrescer. Os níveis de prolina têm resposta semelhante aos da sacarose.

Tal fato explicaria os teores destes metabólitos observados em plantas de patchouli nas condições deste experimento. A redução dos teores de açúcares redutores em condições de restrição hídrica indica a redução de processos de síntese nas plantas, pois esta é a forma de açúcar utilizada em processos metabólicos por possuir uma extremidade redutora. Por sua vez

a sacarose é dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outra de frutose. É um açúcar não redutor, ou seja, uma forma não utilizada em processos metabólicos. Desta forma, em condições de deficiência hídrica o aumento das concentrações de sacarose contribui para o aumento das concentrações de açúcares totais e aminoácidos totais encontrados nas plantas de patchouli, e reforça a hipótese que a deficiência hídrica prejudica o metabolismo primário, bem como um bom suprimento hídrico mantém as plantas com um nível metabólico adequado.

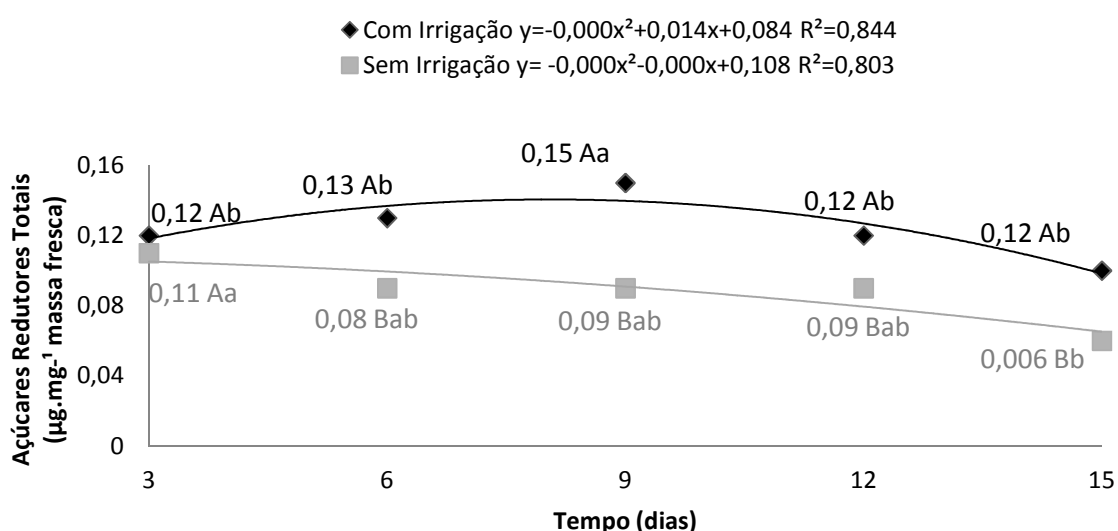


Figura 5. 6 - Concentração de açúcares redutores totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De um modo geral, foi possível observar uma tendência a diminuição dos teores de clorofilas e carotenóides ao longo dos períodos de avaliação tanto em plantas constantemente irrigadas, quanto em plantas submetidas à ausência de irrigação (Figuras 5.7; 5.9 e 5.10). Exceto para os teores de clorofilas *b* os quais tendem a aumentar ao longo dos períodos de avaliação em plantas constantemente irrigadas (Figura 5.8).

Resultados semelhantes foram encontrados em *Mentha spicata* L. e *Rosmarinus officinalis* L. submetidas a deficiência hídrica. Nestas plantas foi possível observar uma redução de biomassa e declínio fotossintético, provavelmente relacionado à diminuição da atividade fotoquímica e da rubisco (DELFINE et al., 2005).

Segundo Carvalho et al. (2006) o acúmulo de prolina e de clorofilas em folhas totalmente expandidas pode ser considerado um parâmetro para avaliação do estresse hídrico

em plantas. Estes autores, observaram em artemísia (*Tanacetum parthenium* L. Schultz – Bip.), maior acúmulo de prolina em plantas submetidas a deficiência hídrica em decorrência de um ajustamento osmótico causado por estresse hídrico. Por outro lado, os teores de clorofilas nessas plantas decresceram indicando uma tendência à senescência nestas condições. Desta forma os resultados obtidos para plantas de patchouli concordam com estes autores. Onde foi possível observar efeito negativo da restrição hídrica sobre o teor de clorofilas, juntamente ao aumento das concentrações de aminoácidos.

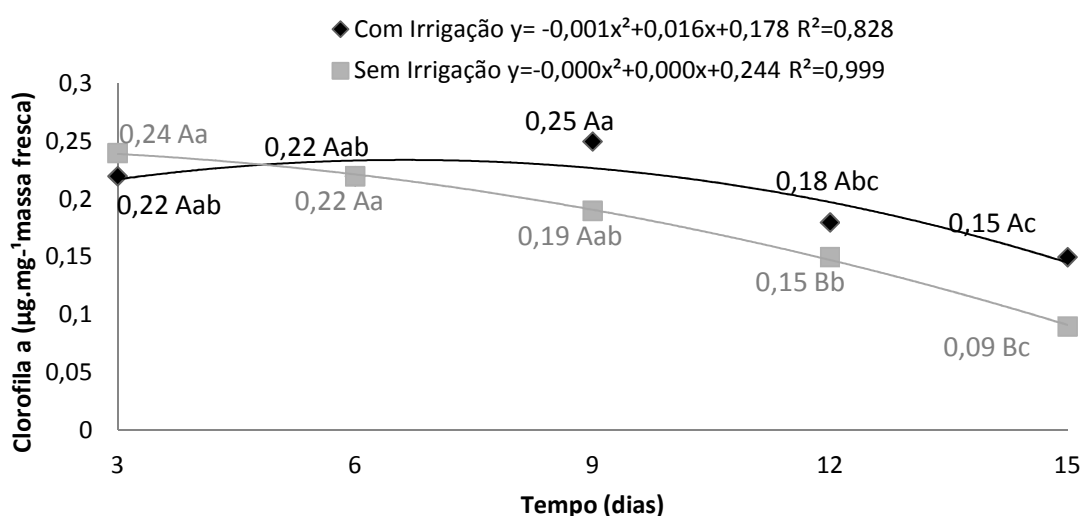


Figura 5. 7 - Concentração de clorofila *a* (µg.mg⁻¹ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

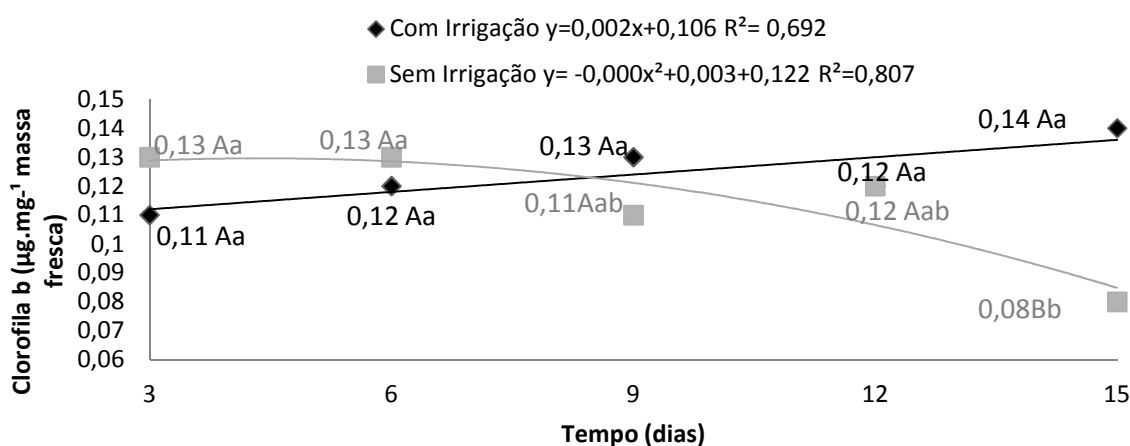


Figura 5. 8 - Concentração de clorofila *b* (µg.mg⁻¹ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias

seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

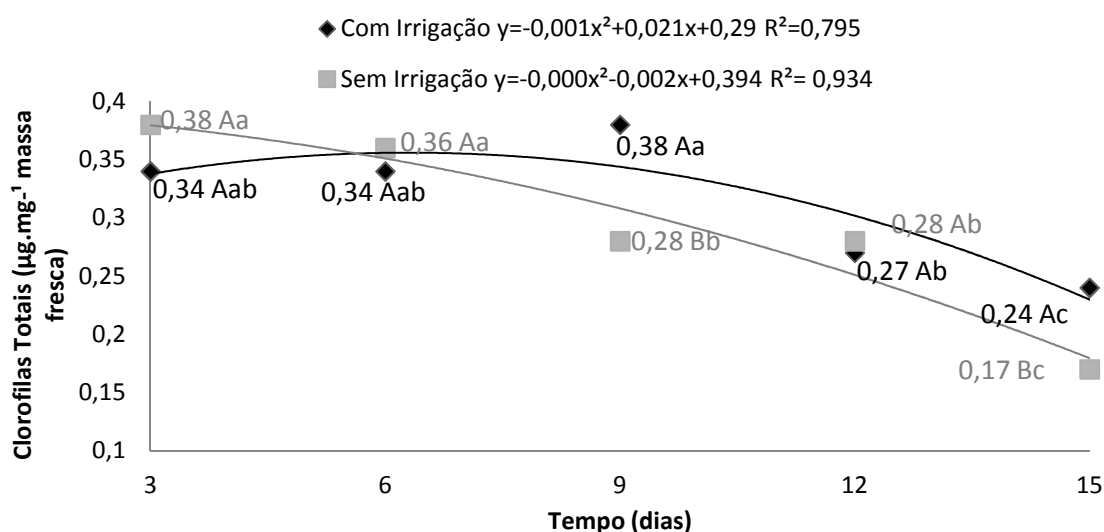


Figura 5. 9 - Concentração de clorofilas totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

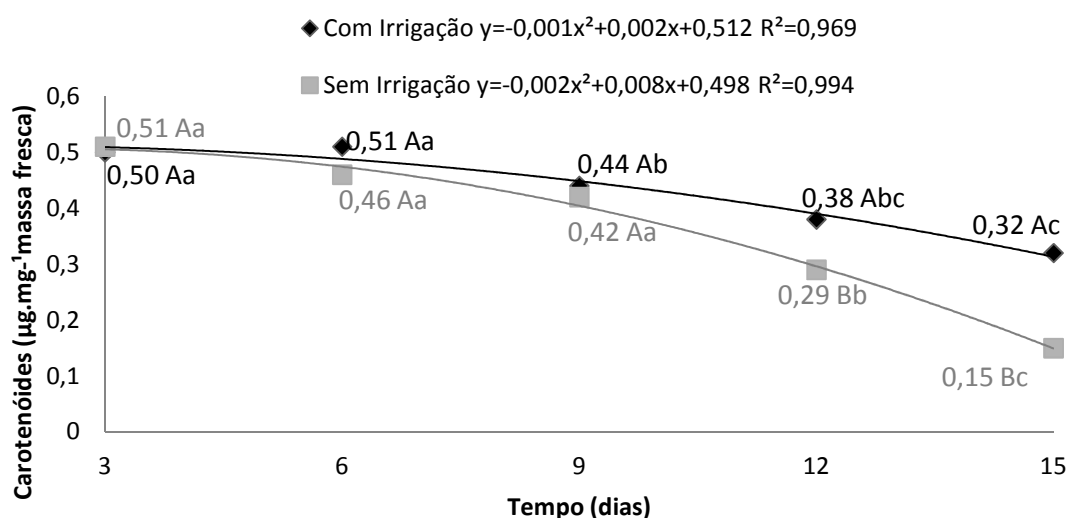


Figura 5. 10 - Concentração de carotenóides ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao comparar o efeito do suprimento hídrico sobre a temperatura foliar, foi possível observar que plantas constantemente irrigadas tendem a apresentar diminuição das temperaturas foliares após o 12º dia de avaliação. Entretanto, em plantas com suspensão de irrigação há uma tendência ao aumento das temperaturas foliares ao longo dos períodos de avaliação (Figura 5.11).

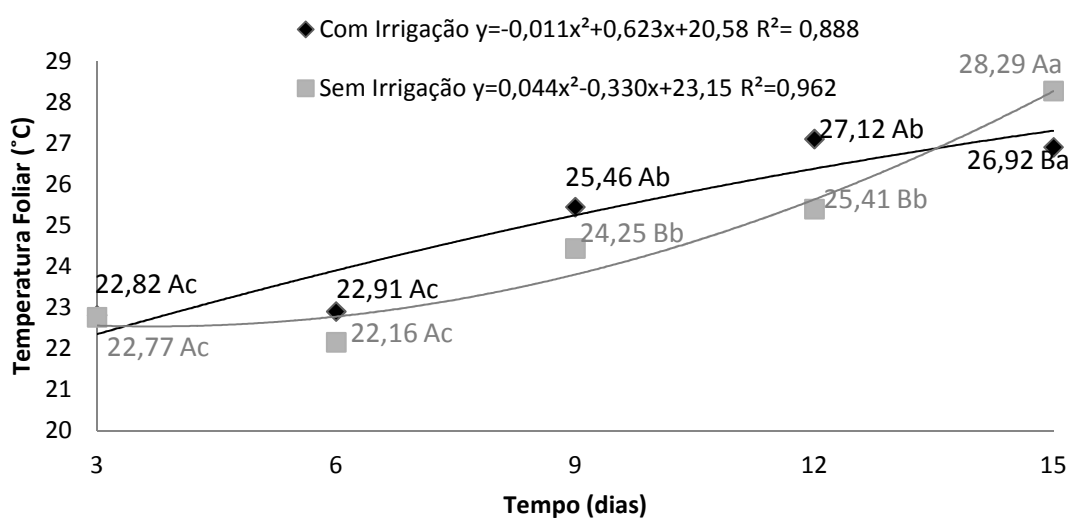


Figura 5. 11 – Temperatura foliar (°C) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à resistência estomática das plantas há uma tendência ao aumento dos níveis até o 9º dia de avaliação. Após este período, é observado o decréscimo da resistência estomática tanto em plantas constantemente irrigadas quanto em plantas com suspensão da irrigação (Figura 5.12).

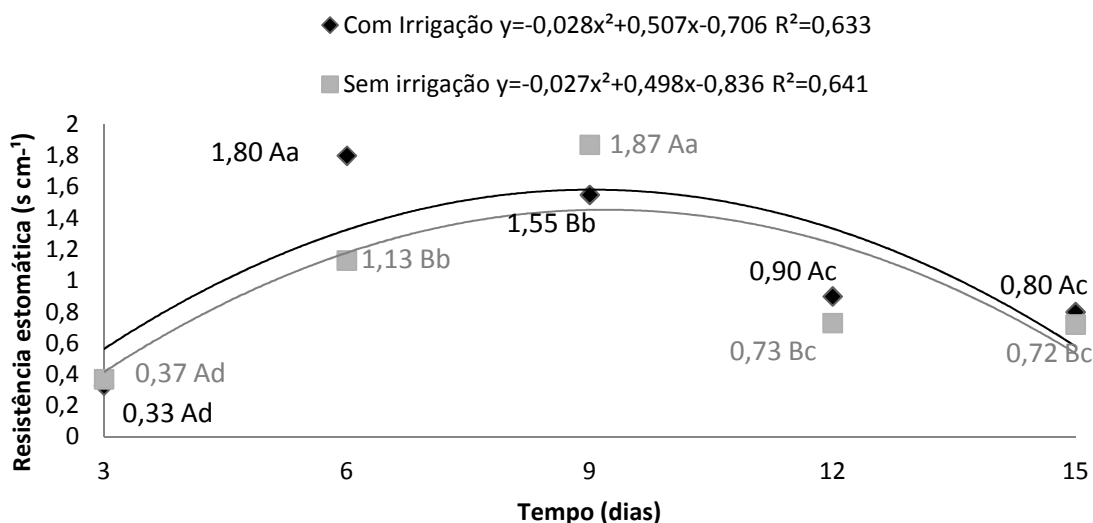


Figura 5. 12 – Resistência estomática ($s\ cm^{-1}$) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De um modo geral, as plantas de patchouli apresentaram uma tendência a diminuir as taxas de transpiração ao longo dos períodos de avaliação. Sendo esta redução mais acentuada em plantas submetidas à ausência de irrigação (Figura 5.13).

Os resultados obtidos para temperatura foliar demonstram que o aumento das temperaturas ao longo dos 15 dias de avaliação nos tratamentos com deficiência hídrica está de acordo com a literatura pesquisada. Este aumento da temperatura foliar pode estar associado ao fechamento estomático reduzindo assim transpiração das plantas. Consequentemente há uma diminuição da capacidade de refrigeração foliar aumentando assim a temperatura foliar (ARAÚJO et al., 2010). Assim como Nogueira et al. (2001) também observou que a manutenção de plantas sob restrição hídrica resultou em redução gradativa das taxas de transpiração.

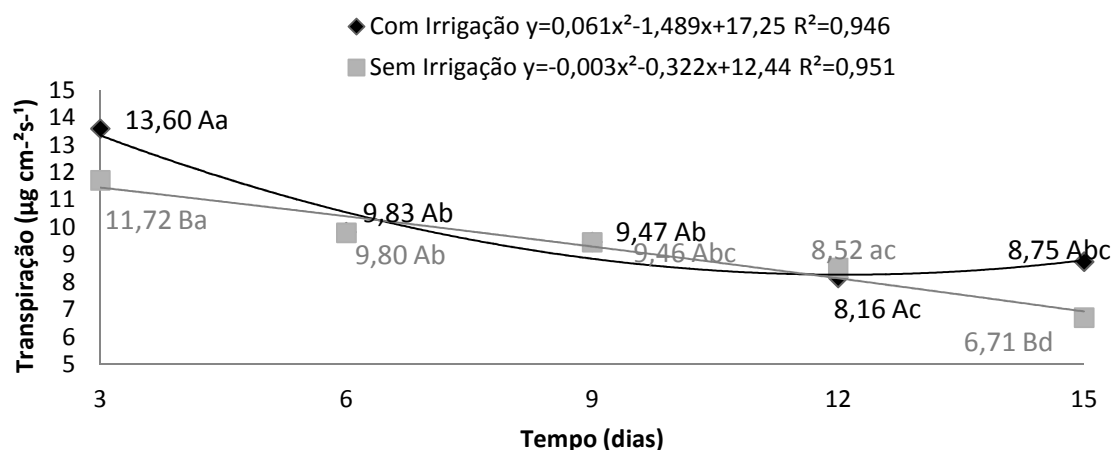


Figura 5. 13 – Transpiração ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{s}^{-1}$) em tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A espessura da epiderme na face abaxial e adaxial foram superiores em plantas constantemente irrigadas. Para os valores de espessura da epiderme abaxial, plantas constantemente irrigadas, apresentaram uma tendência de aumento das médias até o sexto dia de avaliação mantendo-se com baixas pouca variação na espessura até o final do período de avaliação. Entretanto, em plantas não irrigadas esta tendência não se repete, sendo observada a diminuição da espessura ao longo dos períodos de avaliação (Figura 5.14)

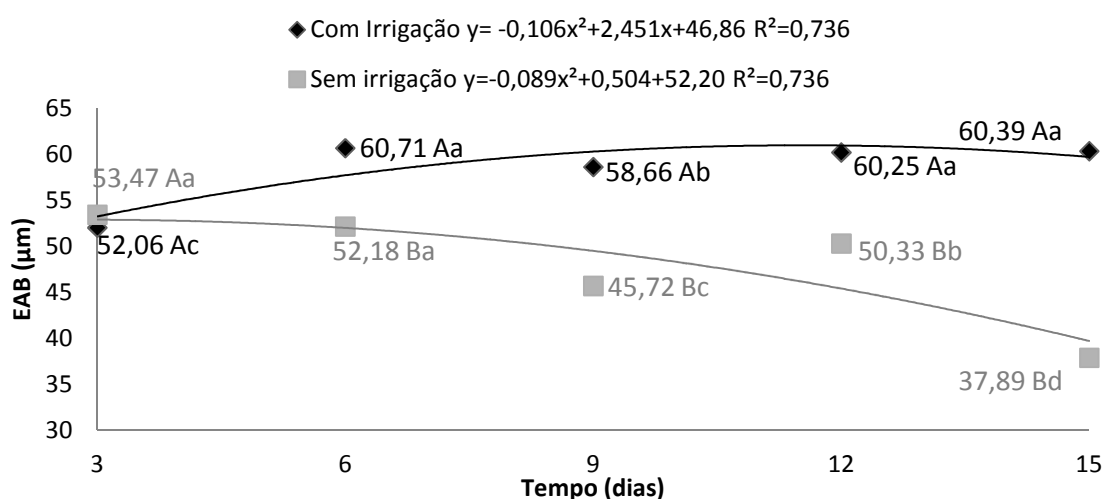


Figura 5. 14 – Espessura da epiderme abaxial (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as médias de espessura da epiderme adaxial a tendência observada se manteve para plantas constantemente irrigadas e com suspensão de da irrigação, apresentando diminuição da espessura ao longo dos períodos de avaliação. Sendo esta redução mais acentuada nas plantas submetidas a restrição hídrica (Figura 5.15).

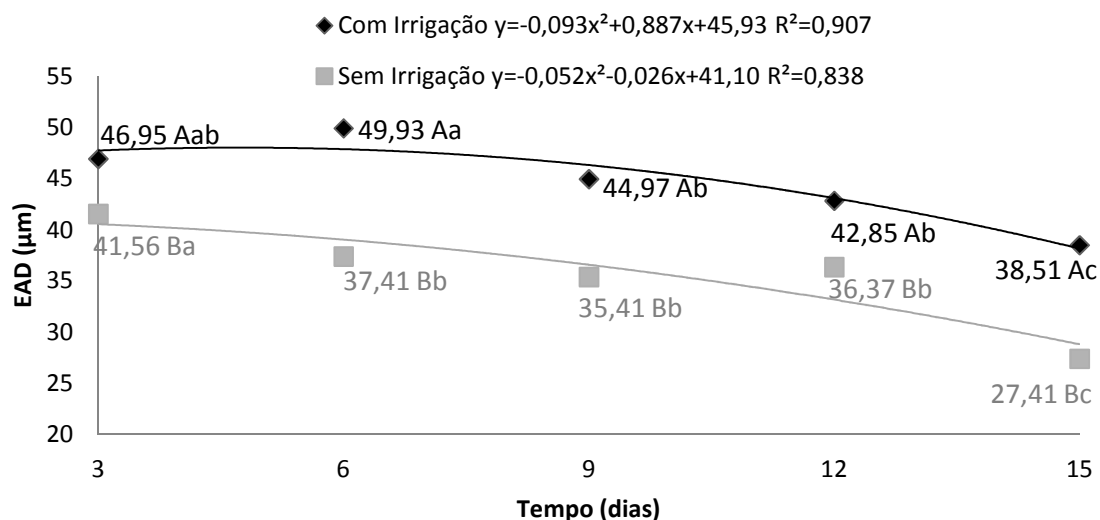


Figura 5. 15 - Espessura da epiderme adaxial (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A mesma tendência observada para os valores de espessura da epiderme adaxial se mantém para o parênquima paliçádico tanto em plantas constantemente irrigadas, quanto para plantas submetidas à restrição de irrigação. Há aumento das espessuras até o 9º dia de avaliação e após este período as médias tendem a decair (Figura 5.16).

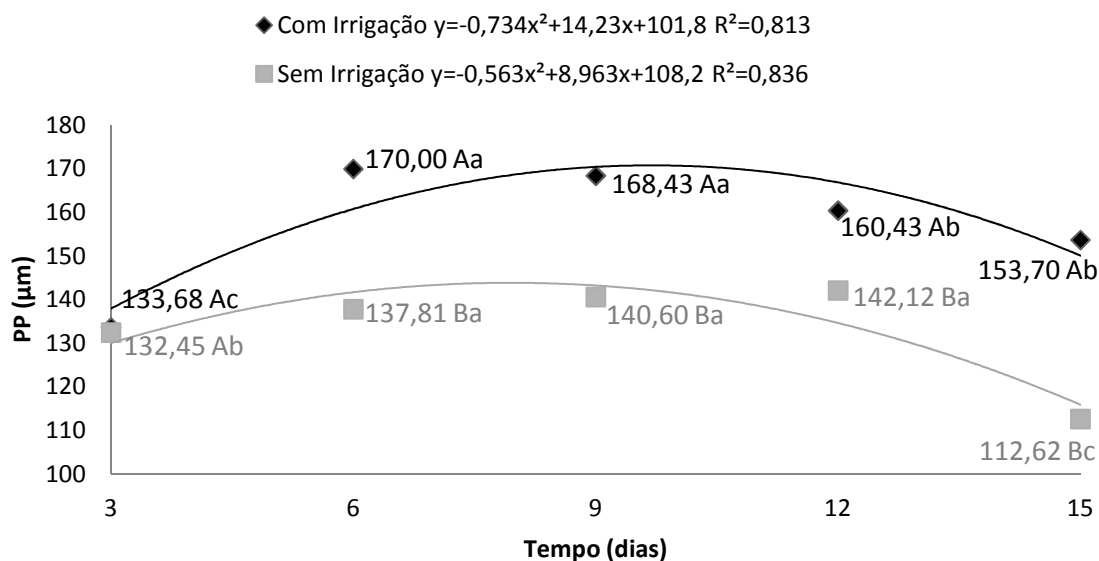


Figura 5. 16 - Espessura do parênquima paliçádico (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as médias de espessura do parênquima lacunoso é observada uma tendência inversa para plantas com restrição de irrigação da observada para plantas constantemente irrigadas. Em plantas não irrigadas as médias tendem a decair ao 6º dia até o fim dos períodos de avaliação. Por outro lado, em plantas constantemente irrigadas após o mesmo período de avaliação, ocorre aumento da espessura do parênquima lacunoso até o fim dos períodos de avaliação (Figura 5.17). Esta tendência também é observada para as médias de espessura da lâmina foliar total (Figura 5.18).

Grisi et al. (2008) ao avaliar o efeito de tratamentos irrigados e não irrigados sob aspectos anatômicos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) observou que não há diferença para espessura da epiderme na face abaxial e adaxial entre os tratamentos. Entretanto, os resultados obtidos neste experimento não concordam com estes autores, pois foi possível observar diferença estatística para estas variáveis, onde de um modo geral os tratamentos irrigados apresentaram maiores médias.

Já os resultados obtidos para a espessura do parênquima paliçádico e lacunoso estão de acordo com Grisi et al. (2008), onde pode-se observar que a deficiência hídrica resulta em menores espessuras dos parênquimas e como consequência menor espessura da lâmina foliar.

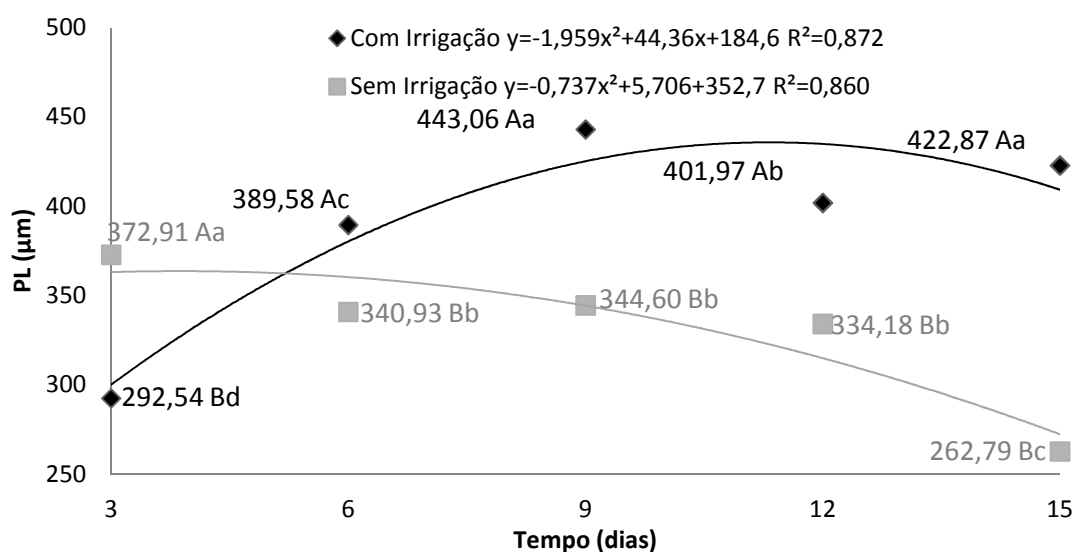


Figura 5. 17 - Espessura do parênquima lacunoso (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

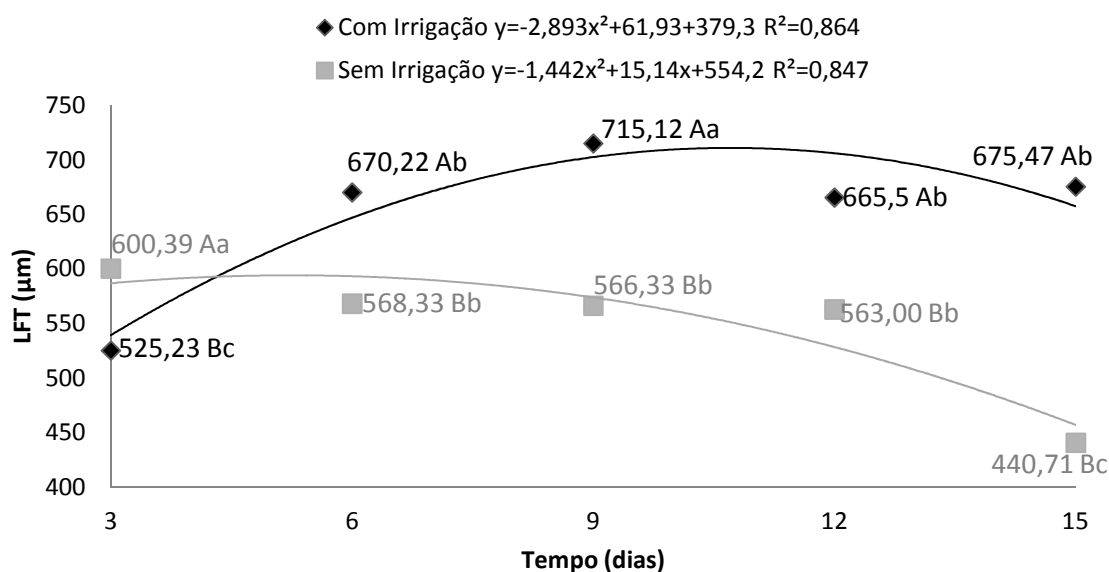


Figura 5. 18 - Espessura da lâmina foliar total (μm) de tecidos foliares de patchouli mantidos em condições de irrigação constante e suspensão total de irrigação ao longo de cinco períodos de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas entre os mesmos períodos de avaliação e minúsculas ao longo dos períodos de avaliação não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 5.19 é possível observar a redução da espessura da lâmina foliar, bem como a desestruturação dos parênquimas em função da restrição da irrigação aos 15 dias de avaliação. Após 15 dias de irrigação constante (Figura 5.19A) é possível observar a organização das estruturas da lâmina foliar bem conservada com a presença de células túrgidas, com epidermes e parênquimas bem delimitados. Ao final dos 15 dias de avaliação, nas plantas submetidas à restrição de irrigação (Figura 5.19B) é possível observar a desorganização do tecido entre os parênquimas os quais apresentam células desidratadas e a diminuição da espessura da epiderme na face abaxial.

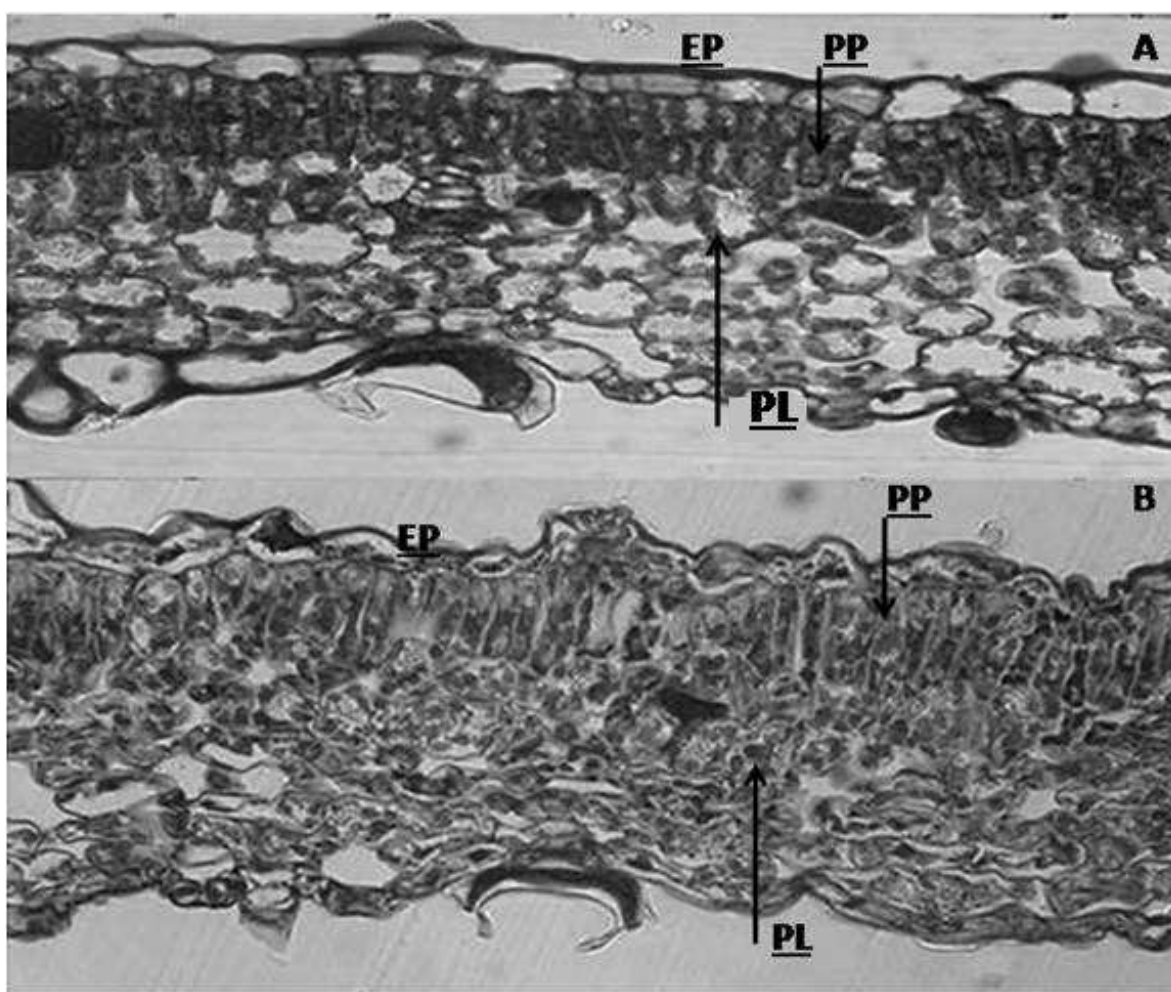


Figura 5. 19 - Secções transversais de lâminas foliares de patchouli. Planta submetida à irrigação constante ao final do experimento (A). Planta submetida à ausência total de irrigação ao final do experimento (B). As setas indicam epiderme (EP), parênquima clorofiliano paliçádico (PP) e parênquima lacunoso (PL). Observe a desestruturação dos parênquimas em plantas não irrigadas.

Pequenas variações na espessura da lamina foliar podem resultar em grandes alterações na taxa fotossintética de algumas espécies (YAMASHITA et al., 2002). Segundo

Castro et al. (2009) a estrutura do parênquima paliçádico está diretamente relacionada ao desempenho fotossintético da planta.

Deste modo, as observações destes autores podem explicar o comportamento das plantas de patchouli frente à restrição hídrica. Onde o baixo suprimento hídrico das plantas resultou na diminuição da espessura do parênquima paliçádico. O que resultou no decréscimo da taxa fotossintética destas plantas evidenciada pela diminuição dos teores de clorofilas, bem como alterações em todo o metabolismo primário destacando-se a diminuição de proteínas solúveis totais e açúcares redutores seguido do aumento das concentrações de aminoácidos totais e açúcares solúveis totais.

Somando-se a isto o aumento das temperaturas foliares e da taxa de transpiração ao longo do tempo que as plantas permaneceram sob restrição hídrica é possível afirmar que baixos suprimentos hídricos são extremamente prejudiciais ao desenvolvimento vegetativo da espécie. Podendo interferir diretamente na produção de óleos essenciais, uma vez que a síntese de compostos secundários utiliza precursores comuns ao metabolismo primário em seus processos de síntese.

5.4. CONCLUSÕES

Os baixos teores de água no substrato causam alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas desfavoráveis ao desenvolvimento da espécie, evidenciados por:

Diminuição da espessura do parênquima paliçádico resultando em decréscimo da taxa fotossintética das plantas;

Diminuição dos teores de proteínas solúveis totais e açúcares redutores;

Aumento dos teores de aminoácidos solúveis totais e açúcares solúveis totais, bem como aumento da temperatura foliar e transpiração das plantas.

5.5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S. A. C.; VASQUEZ, H. M.; CAMPOSTRINI, E.; NETTO, A. T.; DEMINICS, B. B.; LIMA, E. S. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.) em estresse hídrico. **Acta Scientiarum**. v. 32, n.1, p. 1-7, 2010.

BATES, L.S.; WALDERN, R.P.; TEARE, I.D.; Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil, The Hague**, v.39. p.205-07, 1973.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, L. M; CASALI, V. W. D.; LISBOA, S. P.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, 2006.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234p.

COSTA, R. C. L.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; MAIA, P. S. P.; ALVES, G. A. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Biochemical and physiological responses in two *Vigna uviculata* (L.) Walp. Cultivars under water stress. **Jouranl of Agronomy**. v. 7, n. 1, p. 98-101, 2008.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 106, p. 243-252, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.

EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchuli**. Florianópolis, 2004. 58p. (Epagri. Sistemas de Produção, 37).

FIEHN, O. Metabolomics—the like between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155–171. , 2002.

GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café “Catuai” e “Siriema” submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, n. 6, p. 1730-1736, 2008.

HSU, H.C.; YANG, W.C.; TSAI, W.J.; CHEN, C.C.; HUANG, H.Y.; TSAI, Y.C. α -Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 345, n.7, p.1033–1038, 2006.

KHEDR, A. A.; ABBAS, A. A.; ABDEL WAHID, W. P. Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 2553-2562, 2003.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Tradução: Prado, C. H. B. A. São Carlos: Rima, 2006.531 p.

LEICHNOSKI, A.; FREITAS, J. M. N.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas solúveis totais em folhas de teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, s. 2, p. 927-929, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes**. In: Methods in enzymology. Academic Press Inc., v 148, p. 350-382, 1987.

LIU, Y. B.; WNAG, G.; LIU, J.; ZHAO, X.; TAN, H. J.; LI, X. R. Anatomical, morphological and metabolic acclimation in the resurrection plant *Reaumuria soongorica* during dehydration and rehydration. **Journal of Arid Environments**, v. 70, p.183–194, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 3, p 426-428, 1959.

MAIA, P. S. P.; OLIVEIRA, C. F.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; SANTOS, P. C. M.; COSTA, R. C. L. Resposta do déficit hídrico sobre o CRA e teor de aminoácidos solúveis totais em folhas de duas variedades de milho (*Zea Mays* L.). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, s. 2, p, 912-914, 2007.

MOLINARI, H. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P. Evaluation of the estress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* sp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiology Plant**. v.130, p. 218-229.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; BEZERRA, E. E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. v. 59, p.368-373, 1964.

OKUMA, E.; MURAKAMI, Y.; SHIMOISHI, Y.; TADA, M.; MURATA, Y. Effects of exogenous sap placcation of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. **Soil Science Plant Nutrition**. v. 50, p. 1301-1305, 2004.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agrônômico e Fundação IAC,Campinas,p 285,1996.

SADRAS, V. O.; MILROY, S. P. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review. **Field Crops Research**. v. 47, p. 253-266. 1996.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. **A new version of the assistat-statistical assistance software**. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.

SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 82, n.3, p.251–257, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM et.al – 3 ed.- Porto Alegre: artmed, 2004.

UDOMCHALOTHORN, T.; MANEEPRASOBSUK, S.; BANGYEEKUN, E.; BOON-LONG, P.; CHADCHAWAN, S. The role of the bifunctional enzyme, fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, in carbon partitioning during salt stress and salt tolerance in rice (*Oriza sativa* L.). **Plant Science**. v. 176, p. 334-341, 2009.

VASSEY, T. L.; SHARKEY, T. D. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduce starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthesis activity. **Plant Physiology**. v. 89, p. 1066-1070, 1989.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**,Tokio, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

YAMASHITA, N.; KOIKE, N.; ISHIDA, A. Leaf ontogenetic dependence of light acclimation in invasive and native subtropical trees of different successional status. **Plant Cell and Envionment**. v. 25, n. 10, p. 1341-1356, 2002.

6. CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO, PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PATCHOULI APÓS APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTES EM TEORES DECRESCENTES DE UMIDADE DO SUBSTRATO

RESUMO

Patchouli é uma espécie aromática de interesse econômico devido à aplicação do óleo essencial nas indústrias de cosméticos e perfumes. A produção do óleo essencial no patchouli é afetada por diversos fatores ambientais, incluindo a disponibilidade hídrica e reguladores vegetais. Entretanto, não se tem conhecimento da aplicação de reguladores vegetais em associação com outras substâncias tais como vitaminas, conhecidas como bioestimulantes, no desenvolvimento vegetativo, produção de óleo essencial e características bioquímicas desta espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de bioestimulantes e seus compostos isolados em combinação a teores decrescentes de umidade do substrato no desenvolvimento vegetativo, produção do óleo essencial e parâmetros fisiológicos e bioquímicos de patchouli. O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial 2X5 com quatro repetições cada qual com quatro vasos e uma planta por vaso. Os fatores avaliados foram irrigação (presença e ausência) e aplicação de bioestimulante completo composto por extrato de *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, ácido glutâmico e cálcio, bem como seus compostos isolados e testemunha. A aplicação do bioestimulante completo promoveu maior altura em plantas irrigadas. Não houve diferença estatística para o número de folhas entre os tratamentos. O uso de ácido glutâmico isolado em plantas não irrigadas resultou em maior área foliar, massa seca de folhas, produtividade de óleo essencial e teores dos compostos majoritários patchoulol e pogostol. Do mesmo modo, promoveu acréscimo das concentrações de proteínas solúveis totais, clorofilas *b* e totais e diminuiu a temperatura foliar de patchouli.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., Irrigação, Metabolismo Primário, Espécie Aromática, Ácido Glutâmico, Cálcio.

**VEGETATIVE DEVELOPMENT OF PATCHOULI, ESSENTIAL OIL
PRODUCTION, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES AFTER
BIOESTIMULANTS APPLICATION IN DECREASING HUMIDITY LEVELS OF
SUBSTRATE**

ABSTRACT

Patchouli is an aromatic plant with economic importance because of the use of its essential oil by the cosmetic and perfum industries. The essential oil production of patchouli is affected by many factors, including the water and growth regulators. However, no information about the use of growth regulators in combination with other substances, as vitamins, known by biostimulant, on the vegetative development, essential oil production and biochemical parameters is available. The objective of this work was to evaluate the effect of biostimulators and its isolated compounds under reduced substrate moisture on vegetative development, essential oil production and physiological and biochemical parameters of patchouli. The experiment was carried out at greenhouse conditions in a completely randomized design and in a 2x5 factorial with four replications, each one with four pots with one plant. Cada tratamento foi composto por 4 repetições, cada qual com 4 plantas. The evaluated factors were irrigation (with and without) and biostimulant containing extract of *Ascophyllum nodosum* kelp (L.) Le Jolis, L-glutamic acid and calcium, as well as its isolated. The application of the biostimulator resulted on increase of plant weight with irrigation. No statistical differences were observed on the leaf number. The use of glutamic acid in non irrigated plants resulted on increase of leaf area, leaf dry weight, essential oil productivity and patchoulol and pogostol levels. A aplicação do ácido glutâmico isolado em plantas não irrigadas resultou em maior área foliar, massa seca de folhas, maior produtividade do óleo essencial e aumento dos teores dos compostos majoritários patchoulol e pogostol. The protein, total sugars, chlorophyll b and total levels increased under this condition as well and reduced leaf temperature of patchouli.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., Irrigation, Aromatic Species, Glutamic Acid and Calcium.

6.1. INTRODUÇÃO

Pogostemon cablin (Blanco) Benth. (patchouli) é uma espécie nativa da Ásia e cultivada no Caribe, China, Índia, Indonésia, Malásia, Filipinas, África, Vietnã e Brasil. É uma planta perene de hábito herbáceo, com glândulas que produzem óleo essencial (MIYAZAWA et al., 2000; SINGH et al., 2002; ZHAO et al., 2005; WU et al., 2008).

O óleo essencial de patchouli é muito apreciado por parte de indústrias de perfumarias, cosméticos e higiene oral. Há mais de um século é conhecido o fato de que seu constituinte majoritário, patchoulol, é o componente responsável pelo aroma amadeirado característico deste óleo e pela sua capacidade de fixação à pele (HSU et al., 2006; SUGIMURA et al., 2005; ZHAO et al., 2005). Além de propriedades aromáticas, o óleo essencial de patchouli, possui também propriedades farmacológicas que podem variar de acordo com a sua composição (GUBAREVA et al., 2004; KISO et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado propriedades anti-fúngicas, anti-helmínticas, anti-tripanosomas, anti-eméticas, anti-inflamatórias e de analgesia do óleo essencial de patchouli (LU et al., 2011; ZHAO et al., 2005). Em relação ao constituinte majoritário patchoulol, é descrito que possui atividade anti-influenza A (H1N1 e H2N2), indicando que este pode ser um elemento potencial para o uso por parte de indústrias farmacêuticas como um agente anti-influenza (KIYOHARA et al., 2011; WU et al., 2011).

Algumas plantas estão sujeitas a condições de estresse durante seu ciclo de vida, e tais condições podem afetar seu desenvolvimento, crescimento e produtividade agrícola. Sob condições de estresse, bióticos ou abióticos, estas plantas podem apresentar alterações nas concentrações de enzimas antioxidantes, metabólitos osmorreguladores e biossíntese de compostos secundários (OMIDI, 2010; ZHI-LIN et al., 2007). Metabólitos são produtos finais do metabolismo celular, e são importantes indicadores de como sistemas biológicos respondem à alterações do ambiente (FIEHN, 2002). As concentrações de alguns metabólitos são altamente modificadas em função da desidratação, como por exemplo, a sacarose no tecido foliar, que tende a aumentar logo quando as plantas são submetidas à seca. Entretanto, as concentrações de glicose tendem a decrescer e os níveis de prolina têm resposta semelhante aos da sacarose (LIU et al., 2007).

A deficiência hídrica é um fator que não limita apenas o crescimento e a sobrevivência das espécies vegetais, mas induz também diferentes respostas fisiológicas (SANGWAN et al., 2001). O efeito do estresse hídrico sobre a produção de compostos secundários pode variar de acordo com a sua intensidade e duração, podendo aumentar ou reduzir a biossíntese de óleos

essenciais (ANDRADE & CASALI, 1999). Em testes preliminares realizados com patchouli foi possível observar que o nível de umidade do substrato influencia diretamente o desenvolvimento vegetativo e a produção de óleos essenciais.

Bioestimulantes são compostos orgânicos que quando aplicados em pequenas quantidades promovem aumento do desenvolvimento vegetativo das plantas. Ainda, se estes compostos forem aplicados antes de um evento de estresse, podem ajudar as plantas a tolerar este estresse. Extratos de algas marinhas e ácido húmico são compostos frequentemente presentes nas formulações de bioestimulantes (SCHIMIDT et al., 2003). Podendo haver também, misturas de reguladores vegetais associados a aminoácidos, vitaminas e nutrientes na composição de alguns bioestimulantes (VIEIRA, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que extratos de algas marinhas protegem plantas de um grande número de estresses bióticos e abióticos (KHAN et al., 2009). Além disso, a utilização do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis promove tolerância à seca em gramíneas. (ZHANG & ERVIN, 2004). Em plantas de patchouli, a aplicação do extrato de *A. nodosum* aumenta a produtividade do óleo essencial e as concentrações do constituinte majoritário patchoulol (STORCK, 2008).

Mógor et al. (2008) relatam o efeito bioestimulante do composto contendo extrato de alga marinha *A. nodosum*, cálcio e ácido L - glutâmico em *Phaseolus vulgaris* L., aumentando o desenvolvimento vegetativo da espécie. Deste modo, sabendo-se que os níveis de umidade do substrato alteram o rendimento e a composição do óleo essencial de patchouli, este trabalho teve como objetivo testar a aplicação do composto bioestimulante (extrato de alga marinha, ácido L-glutâmico e cálcio) e de seus compostos isolados no desenvolvimento vegetativo, produção de óleos essenciais e alterações bioquímicas de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em condições de casa de vegetação durante os meses de dezembro de 2009 a março de 2010. O material vegetal utilizado constituiu-se de plantas de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.), sendo as mudas obtidas por estaquia (6 cm de comprimento com um par de folhas com área foliar reduzida à metade) e mantidas em vasos (17cm de altura e 23 cm de diâmetro) com capacidade para aproximadamente 6 kg de substrato (solo).

Para a implantação do experimento amostras do substrato foram coletadas para análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos da UFPR, o qual apresentou as seguintes características: CaCl_2 6,10; SMP 6,60, Al^{+3} ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 0,00; $\text{H}+\text{Al}^{+3}$ ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 3,20; Ca^{+2} ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 7,90; Mg^{+2} ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 3,60; K^+ ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 1,58; $\text{SB}(\text{cmol}_c/\text{dm}^3)$ 13,08; T ($\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) 16,28; P (mg/dm^3) 237,60; C (g/dm^3) 35,1; V(%) 80; m(%) 0; Ca/Mg 2,2 e argila (g/kg) 550,00. Para a correção do pH do solo, foi incorporado 8,3 toneladas. ha^{-1} de calcário (100% PNRT) (RAIJ et al., 1996). Foi incorporado 40kg/ ha^{-1} de N, 45kg/ ha^{-1} de P_2O_5 e 40 Kg/ ha^{-1} de K_2Cl .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X5, correspondente aos fatores irrigação (presença e ausência) e aplicação de bioestimulante completo (Plenno®) composto por extrato de alga marinha, ácido L-glutâmico e cálcio na forma de cloreto de cálcio; extrato de alga marinha (Acadian®); ácido glutâmico cálcio na forma de cloreto de cálcio e testemunha (água destilada). Cada tratamento foi composto por 4 repetições, cada qual com 4 plantas. A concentração final das soluções de extrato de alga marinha e ácido L-glutâmico foram de 15 g.L^{-1} e a concentração de cálcio foi de 100g. L^{-1} .

A aplicação dos tratamentos foi realizada em duas etapas, uma aos 80 dias e outra aos 90 dias após o transplante das mudas para os vasos. Durante os primeiro 80 dias as plantas foram irrigadas em dias alternados com volume de 200 mL em cada vaso. Para a aplicação dos tratamentos, as plantas foram divididas em dois grupos, com irrigação constante e com suspensão total da irrigação durante 10 dias. Decorrido este período (90 dias após o transplante) os dois grupos de plantas receberam mais uma aplicação dos tratamentos e a irrigação foi retomada em dias alternados também com 200 mL. Até os 100 dias quando foi realizada a avaliação do experimento (Figura 6.1).

Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se equipamento de pulverização com pressão e vazão constantes (HERBICAT HBPE003, série OP 3063, com cilindro LUXFER com capacidade para 5 kg). O volume das soluções contendo o bioestimulante completo e cada um dos constituintes isolados foi de 30 mL para a primeira aplicação e de 50 mL na segunda aplicação dos tratamentos.

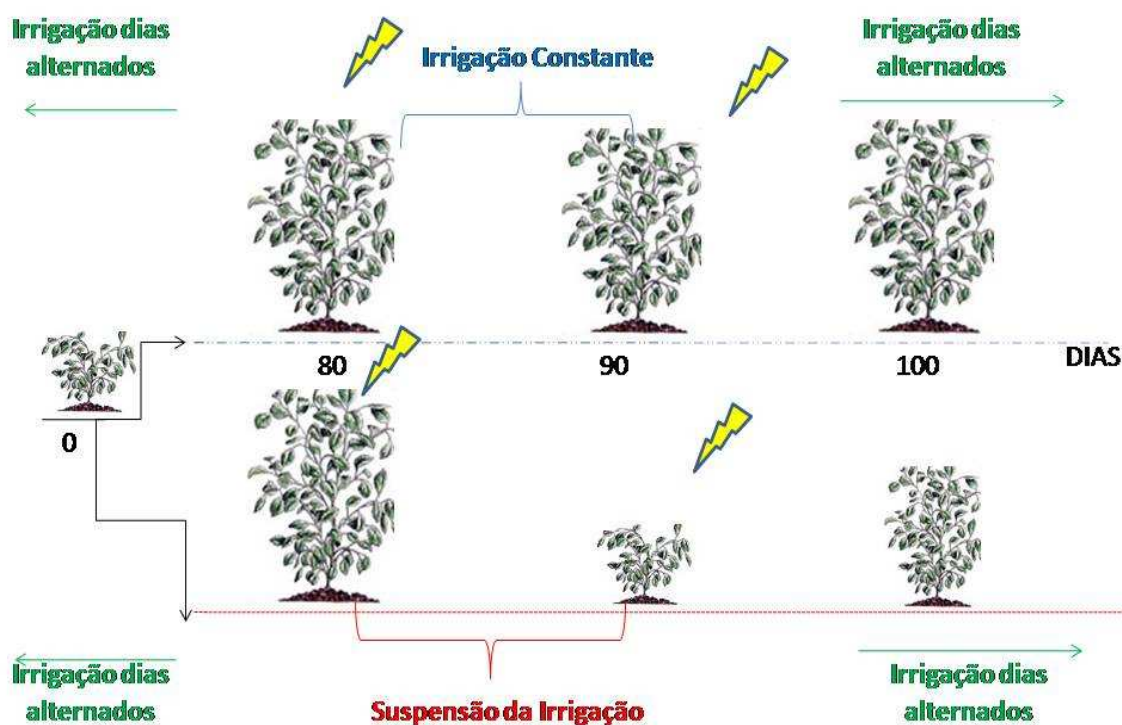


Figura 6. 1 – Esquema da condução do experimento em casa-de-vegetação. Dia zero indica o plantio das mudas com irrigação em dias alternados até 80 dias após o plantio. Aos 80 dias as plantas são subdivididas em grupos com suspensão total da irrigação e irrigação constante. Aos 90 dias após o plantio é retomada a irrigação das plantas em dias alternados. Dia 100 indica o momento da coleta das plantas para avaliação. Observe as setas, estas indicam o momento das aplicações do bioestimulantes e seus compostos isolados.

Para determinação do nível de umidade do substrato foram retiradas amostras com o auxílio de um trado calador. As amostras foram pesadas e mantidas em estufa (FANEM 320-SE) com circulação de ar forçada a 65°C até peso constante (Figura 6.2).

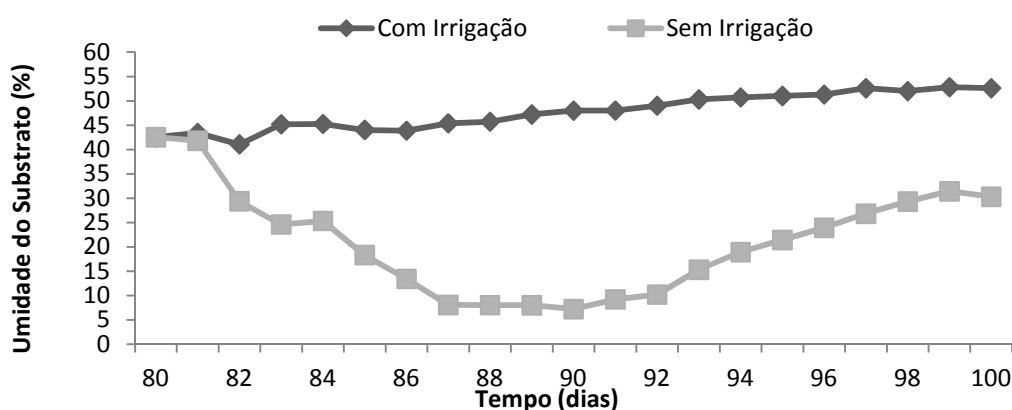


Figura 6. 2 - Porcentagem de umidade do substrato do momento do início da aplicação dos tratamentos (80 dias) em plantas constantemente irrigadas e com ausência total de irrigação (80 a 90 dias) e após a retomada da irrigação em dias alternados até o momento da coleta das plantas (90 a 100 dias).

O desenvolvimento vegetativo do material foi avaliado por meio da determinação da área foliar (FERNANDES, 2000), altura (cm), número de folhas e ramos e massa seca de folhas e ramos.

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação durante 5 horas em aparelho graduado Clevenger e balão volumétrico com capacidade para 2L utilizando-se 30g tecido foliar com aproximadamente 20% de umidade em 1L de água destilada. Após a extração, as amostras de óleo essencial foram centrifugadas, quantificadas com base na densidade do óleo e seu teor corrigido para base seca.

A análise das amostras para identificação da porcentagem dos constituintes do óleo essencial foi realizada por meio de cromatografia em fase gasosa (CG) utilizando-se um equipamento Varian modelo CP 3800, com detector de ionização de chama (CG-DIC); coluna capilar HP5 (5%-fenil-95%-metilsilicone, 30 m X 0,32 mm X 0,25 μ m). As condições de análise foram as seguintes: a) temperatura do injetor: 250°C, split 1:20; b) quantidade de amostra injetada: 1,0 μ L; c) gás de arraste: hélio a 1,0 mL min⁻¹ na temperatura de 40°C; d) temperatura do detector DIC: 250°C; e) programação da temperatura do forno: inicial 60°C, elevação da temperatura a 240°C na razão de 3°C por minuto.

Os constituintes do óleo essencial foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em sistema Agilent 5973N; coluna capilar HP5MS (5%-fenil-95%-metilsilicone, 30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m). O detector de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV. A fonte de íons foi operada a 230°C, o analisador de massas a 150°C e a linha de transferência a 260°C. A faixa de massas analisada foi de 40 a 450 u, com 3,15 varreduras por segundo. As demais condições de análise foram às mesmas descritas para a CG.

Os índices de retenção linear foram calculados segundo Van Del Dool e Kratz (1963) pela injeção de uma série de n-alcanos (C7-C26) na mesma coluna e sob as condições indicadas acima para a análise de CG. A identificação dos constituintes do óleo foi realizada através de pesquisa na espectroteca Wiley 6ª edição e pela comparação dos índices de retenção calculados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Para avaliação das características bioquímicas das plantas de patchouli avaliou-se os teores de proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976), aminoácidos solúveis totais (BATES, 1973), açúcares solúveis totais (DUBOIS et al., 1956) e açúcares redutores (MILLER, 1959), sendo estes determinados a partir de curva padrão e leitura em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601. Os teores de pigmentos fotossintetizantes foram determinados a partir das equações descritas por Lichtenthaler (1987). Para cada

determinação utilizou-se 500 mg de material vegetal fresco extraído do quarto par de folhas totalmente expandidas.

A temperatura foliar, resistência estomática, transpiração e foram determinadas utilizando-se um porômetro “Steady State” da marca Li-Cor modelo 1600. As medições foram realizadas sempre às 12 horas, em folhas apicais, medianas e basais de três plantas de cada uma das quatro repetições, sendo realizadas três leituras para cada folha avaliada.

As análises de variâncias foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao fator irrigação, pode-se observar que não houve diferença estatística para altura de plantas de patchouli entre os tratamentos irrigados e não irrigados. Tanto em plantas irrigadas quanto em plantas não irrigadas a aplicação do extrato de alga marinha e de ácido L-glutâmico levou à diminuição da altura das plantas. Os tratamentos com bioestimulante completo e cálcio não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Para o número de folhas, também não houve diferença estatística entre os fatores (Tabela 6.1). Entretanto, pode-se observar nos tratamentos irrigados a diminuição da área foliar em plantas tratadas com extrato de alga marinha e com ácido glutâmico. Por outro lado, nos tratamentos não irrigados a aplicação de bioestimulante e extrato de alga marinha promoveram menor área foliar das plantas. Os diferentes níveis de irrigação do substrato não resultaram em diminuição da área foliar. No entanto, em plantas não irrigadas e tratadas com bioestimulante houve redução e de forma contrária, em plantas não irrigadas e tratadas com ácido glutâmico houve aumento da área foliar.

Para o número de ramos foi possível observar, que em plantas irrigadas somente a aplicação do bioestimulante promoveu aumento em relação à testemunha. Em plantas não irrigadas a aplicação dos tratamentos também resultou em menor número de ramos em comparação aos tratamentos irrigados. Com exceção da aplicação de ácido glutâmico, a qual resultou em maior número quando comparado ao tratamento irrigado.

Em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, foi possível observar que até mesmo baixas concentrações de extrato de alga *A. nodosum* são capazes de promover aumento do

número de folhas e altura das plantas (RAYORATH et al., 2008). Em *Apium graveolens* L. var. *rapaceum* a aplicação de extrato de aminoácidos contendo ácido glutâmico e extrato de alga marinha separadamente, também promoveram aumento no número de folhas e altura das plantas (SHEHATA et al., 2011). Entretanto, Schimidt et al. (2003) avaliam que a aplicação de compostos bioestimulantes em pequenas concentrações e em maior número de aplicações promovem resultados superiores quando comparados a elevadas concentrações de bioestimulantes em poucas aplicações. Pois, grande parte dos compostos bioestimulantes e o extrato de alga marinha, possuem reguladores vegetais em sua composição e o excesso destes compostos pode ser prejudicial às plantas. Além disto, estes compostos exercem efeito por um curto período de tempo e depois sua atividade decai gradualmente. Tal fato pode explicar os resultados encontrados em plantas de patchouli, onde possivelmente um maior número de aplicações dos tratamentos e em menores concentrações poderia ter resultado em melhor desenvolvimento vegetativo das plantas.

Em relação à massa seca de folhas, foi possível observar que plantas não irrigadas apresentaram menor produção de massa seca foliar em relação às plantas irrigadas. Nos tratamentos irrigados, a aplicação de bioestimulante e de seus compostos promoveram decréscimo da massa seca foliar, com exceção do tratamento com extrato de alga marinha, o qual apresentou valores estatísticos iguais a testemunha. Por outro lado, em plantas não irrigadas a aplicação de ácido glutâmico promoveu aumento da massa seca foliar, sugerindo que nestas condições a aplicação desse produto atua na manutenção dos processos metabólicos das plantas, reduzindo os efeitos negativos da ausência de água sobre o desenvolvimento vegetativo. Indicando que o ácido L-glutâmico possa ter sido utilizado como osmorregulador promovendo maior acúmulo de massa seca. Uma vez que a prolina é sintetizada a partir do ácido L- glutâmico, em condições de estresse hídrico e em decorrência de um ajustamento osmótico, e tal ajustamento osmótico protege as células da desidratação (YOSHIBA et al., 1997). Nos tratamentos irrigados, a aplicação do composto bioestimulante completo ou de seus compostos, não promoveu diferença estatística na massa seca de ramos. Nos tratamentos não irrigados, a aplicação do extrato de alga marinha reduziu a massa seca de ramos. Entretanto, a aplicação de ácido glutâmico que nestas condições não diferiu estatisticamente da testemunha, promoveu maior massa seca de ramos quando comparado à sua aplicação em plantas irrigadas (Tabela 6.1).

Tabela 6. 1- Altura (cm), número de folhas, área foliar (cm²) e número de ramos de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e após a aplicação de bioestimulantes e seus compostos isolados. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca
Altura					
Com irrigação	48,76 ABa	52,16 Aa	45,90 Ba	47,72 Ba	49,19 Aba
Sem irrigação	49,94 Aa	45,39 ABb	43,41 Ba	44,90 Ba	45,09 ABb
Número de folhas					
Com irrigação	703,50ns	653,00ns	782,00ns	798,75ns	709,75ns
Sem irrigação	633,50ns	676,50ns	701,75ns	703,75ns	662,75ns
Área foliar					
Com irrigação	92,21 Aa	81,58 ABa	62,55 Ca	75,00 BCb	78,00ABa
Sem irrigação	93,93 ABa	66,74 Cb	68,93 Ca	99,97 Aa	80,37BCa
Número de Ramos					
Com irrigação	7,50 Ba	9,55 Aa	8,95 ABa	7,70 ABb	9,30 ABa
Sem irrigação	8,00 ABa	8,05 ABb	6,25 Bb	9,70 Aa	7,95 ABb
Massa Seca de Folhas					
Com irrigação	88,89 Aa	66,65 Ca	86,19 Aa	73,66 BCb	80,38 ABa
Sem irrigação	75,29 Bb	65,73 Ca	61,74 Cb	84,80 Aa	77,39 ABa
Massa Seca de Ramos					
Com irrigação	41,60 Aa	42,16 Aa	36,16 Aa	36,55 Aa	40,63 Aa
Sem irrigação	40,74 Aa	33,98 ABb	28,33 Bb	40,19 Aa	35,66 Ab

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns não significativo.

Para o teor de óleo essencial, houve diferença estatística entre os tratamentos irrigados e com suspensão de irrigação, sendo este último o que promoveu maiores teores. Ao comparar o efeito da aplicação dos tratamentos em plantas irrigadas, pode-se observar que o composto bioestimulante e ácido L-glutâmico promoveram aumento no teor de óleo essencial em relação à testemunha. Entre tanto, a aplicação de extrato de alga marinha foi o que promoveu maiores médias em relação aos demais nas plantas irrigadas, concordando com os resultados obtidos por Storck (2008). Após a suspensão da irrigação, pode-se observar que a aplicação dos tratamentos reduziu o teor do óleo essencial, com exceção da aplicação do composto bioestimulante que não diferiu da testemunha.

Em relação à produtividade do óleo essencial, houve diferença estatística entre tratamentos irrigados e não irrigados. De modo contrario ao teor de óleo essencial, a produtividade maior foi observada em tratamentos irrigados. Nestas condições, a aplicação do composto bioestimulante completo e de seus compostos promoveram decréscimo na produtividade do óleo essencial. Após a suspensão da irrigação observou-se que a aplicação do ácido L-glutâmico promoveu maior produtividade de óleo essencial, seguidos dos tratamentos com aplicação de cálcio, extrato de alga marinha e composto bioestimulante completo (Tabela 6.2).

Em *Mentha spicata* L. e *Rosmarinus officinalis* L. submetidas a estresse hídrico, foi possível observar, uma redução de biomassa e declínio fotossintético, provavelmente relacionado a diminuição da atividade fotoquímica e da rubisco (DELFINE et al., 2005). Também é relatado que as adaptações bioquímicas das plantas a diferentes ambientes envolvem o metabolismo primário e secundário destas (CARVALHO et al., 2006), pois metabolitos gerados pelo metabolismo primário das plantas são utilizados como precursores de compostos secundários, tais como os óleos essenciais (SANGWAN et al., 2001).

Deste modo, pode-se relacionar a maior produtividade do óleo essencial no tratamento sem irrigação e com aplicação do ácido glutâmico a maior área foliar e massa seca de folhas encontradas nestas plantas, uma vez que as estruturas de síntese e armazenamento de óleos essenciais do patchouli são encontradas internamente em suas folhas (HENDERSON et al., 1970).

Tabela 6. 2 - Teor (%) e produtividade ($L \cdot ha^{-1}$) do óleo essencial de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e aplicação de bioestimulante. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca
Teor					
Com irrigação	2,43 Db	3,14 Cb	5,49 Aa	4,12 Ba	2,86 CDb
Sem irrigação	4,56 Aa	4,92 Aa	3,07 Bb	3,04 Bb	3,27 Ba
Produtividade					
Com irrigação	1,96 Aa	1,69 Ca	1,84 Ba	1,47 Db	1,70 Ca
Sem irrigação	1,25 Db	1,55 Cb	1,57 Cb	1,68 Aa	1,60 Bb

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Em relação à composição do óleo essencial de patchouli, a análise cromatográfica revelou a presença dos seguintes componentes patchoulol+pogostol, alfa-guaieno+seicheleno, alfa-bulneseno, alfa-humuleno + alfa-patchouleno, óxido de cariofileno, nor-patchoulol, (E)-cariofileno, allo-aromandreno, acifileno, beta-patchouleno, beta-elemenol, cis-thujopsenal e cicloseicheleno. Dentre estes compostos, destaca-se a presença do Patchoulol e do Pogostol, considerados compostos majoritários do óleo essencial de patchouli (DEGUERRY et al, 2006).

Ao comparar o efeito da irrigação os constituintes majoritários patchoulol e pogostol apresentaram maiores médias quando irrigados. Ainda nestas condições, a aplicação do composto bioestimulante completo foi superior aos demais tratamentos. Após a suspensão da irrigação, a aplicação do composto bioestimulante completo proporcionou aumento destes constituintes em relação à testemunha. Entretanto, para os constituintes alfa-guaieno+seicheleno não houve interação significativa entre os fatores, nem diferença entre os fatores de forma isolada.

Para o constituinte alfa-bulneseno, a irrigação das plantas promoveu os maiores teores, por outro lado, nestas condições a aplicação de extrato de alga marinha e de cálcio diminuíram as concentrações deste constituinte no óleo essencial. Após a suspensão da irrigação foi observado aumento nas concentrações de alfa-bulneseno quando aplicado o composto bioestimulante completo. Para os compostos alfa-humuleno+alfa-patchoulol e óxido de cariofileno, não houve diferença entre os tratamentos irrigados e não irrigados. Por outro lado, ao comparar o efeito dos fatores de forma isolada, foi possível observar que em plantas não irrigadas a aplicação de cálcio aumentou os teores de alfa-humuleno+alfa-patchoulol. Em relação ao óxido de cariofileno, foi possível observar que a aplicação de bioestimulante completo, ácido L-glutâmico e cálcio diminuíram as concentrações deste constituinte em relação à testemunha em plantas irrigadas. Após a suspensão da irrigação também foi observados decréscimo nas concentrações destes constituintes quando aplicado o bioestimulante completo e seus compostos de forma isolada.

Não houve interação significativa entre os fatores para o constituinte nor-patchoulol. Houve somente diferença do fator compostos bioestimulante de forma isolada, onde a aplicação de extrato de alga marinha foi superior em plantas não irrigadas. Em relação às concentrações de (E)-cariofileno não houve diferença entre os tratamentos quando comparada a irrigação das plantas. Ao comparar o efeito da aplicação de compostos bioestimulantes de forma isolada, foi possível observar que a aplicação de extrato de alga marinha, ácido L-glutâmico e cálcio decresce as concentrações deste constituinte quando a irrigação das plantas

é mantida, e quando a irrigação é suspensa a aplicação de ácido L-glutâmico e cálcio também provocam decréscimo dessas concentrações.

Para as concentrações de allo-aromandreno no óleo essencial de patchouli observou-se que não houve efeito da irrigação. Entretanto, houve efeito de forma isolada da aplicação dos compostos bioestimulantes. Quando aplicados em condições de irrigação o bioestimulante completo e o cálcio diminuem a concentração deste constituinte. Já em ausência de irrigação o decréscimo é causado pela aplicação de cálcio e ácido L-glutâmico. Da mesma forma, não há diferença no o fator irrigação para as concentrações de acifileno no óleo essencial. Quando aplicado o bioestimulante completo e seus compostos isolados, todos causaram decréscimo da concentração de acifileno em plantas irrigadas. Após a suspensão da irrigação também é observado o decréscimo das concentrações deste constituinte quando aplicado ácido L-glutâmico e cálcio.

Os tratamentos sem irrigação promoveram maiores concentrações de beta-patchouleno e beta-elemeneno. Ao comparar o efeito da aplicação dos compostos pode-se observar que todos resultaram diminuição das concentrações de beta-patchouleno com exceção do cálcio tanto em plantas irrigadas quanto em plantas não irrigadas. Para beta-elemeneno a aplicação de ácido L-glutâmico em plantas irrigadas aumenta as concentrações deste constituinte. De forma contrária, a aplicação do bioestimulante e seus compostos diminuem estas concentrações quando aplicados em plantas submetidas a ausência de irrigação.

Tanto para o constituinte cis-thujopsenal quanto para o cicloseicheleno, não houve efeito do fator irrigação. Por outro lado, quando aplicado cálcio em plantas irrigadas e não irrigadas, este promoveu acréscimo nas concentrações dos dois constituintes em condições de irrigação e não irrigação. Ao observar a rota metabólica de síntese dos compostos do óleo essencial de patchouli (DEGUERRY et al, 2006), é possível compreender que tanto a síntese do patchoulol quanto do pogostol utilizam-se de moléculas de água para a sua formação. Na ausência de água a síntese é direcionada para a formação dos compostos minoritários.

Tabela 6. 3 - Composição do óleo essencial de patchouli em diferentes níveis de umidade do substrato e aplicação de bioestimulantes. Bioestimulante completo (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	IR	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca
Patchoulol +						
Pogostol						
Com Irrigação	1657	72,2 Ba	77,0 Aa	72,1 Ba	71,1 Ba	68,8 Ba
Sem Irrigação		69,3 Bb	76,0 Aa	72,2 ABa	73,9 Aa	63,6 Cb
Alfa-Guaieno +						
Seicheleno						
Com Irrigação	1439	7,5 ns	8,0 ns	7,0 ns	7,0 ns	5,3 ns
Sem Irrigação		7,6 ns	7,43 ns	7,48 ns	6,64 ns	6,56 ns
Alfa-Bulneseno						
Com Irrigação	1504	5,9 Aa	5,8 Aa	4,0 Bb	6,1 Aa	1,9 Cb
Sem Irrigação		5,0 BCb	6,1 Aa	5,6 ABa	4,7 Cb	3,5 Da
Alfa-Humuleno +						
Alfa-Patchouleno						
Com Irrigação	1453	2,7 Aa	3,0 Aa	2,8 Aa	2,4 Aa	2,4 Ab
Sem Irrigação		2,7 ABa	2,5 Bb	2,5 Ba	2,4 Ba	3,3 Aa
Óxido de Cariofileno						
Com Irrigação	1579	1,4 Aa	0,9 Ba	1,6 Aa	1,0 Ba	0,8 Ba
Sem Irrigação		1,4 Aa	0,2 Cb	1,1 ABb	1,0 Ba	0,9 Ba
Nor-Patchoulenol						
Com Irrigação	1552	1,1 Aa	1,3 Aa	1,0 Ab	1,3 Aa	1,1 Aa
Sem Irrigação		1,1 Aa	1,2 Aa	1,4 Aa	1,2 Aa	1,1 Aa
(E)-Cariofileno						
Com Irrigação	1417	1,3 Aa	1,2ABb	0,7 Cb	1,1 Ba	0,5 Db
Sem Irrigação		1,3 Aa	1,4 Aa	1,2 Aa	0,8 Bb	0,7 Ba
Allo-Aromandreno						
Com Irrigação	1456	1,0 Aa	0,2 Bb	1,0 Aa	1,0 Aa	0,0 Ba
Sem Irrigação		1,1 Aa	0,9 ABa	0,9 ABa	0,8 Ba	0,0 Ca
Acifileno						
Com Irrigação	1495	0,8 Aa	0,3 Cb	0,3 Cb	0,6 Ba	0,0 Da
Sem Irrigação		0,8 Aa	0,8 Aa	0,7 Aa	0,4 Bb	0,0 Ca
Beta-Patchouleno						
Com Irrigação	1379	0,1 Db	0,0 Ea	0,3 Ca	0,6 Bb	1,2 Aa
Sem Irrigação		0,6 Ba	0,0 Da	0,1 Cb	0,6 Ba	1,1 Ab
Beta-Elemeneno						
Com Irrigação	1390	0,2 Bb	0,0 Ca	0,2 Ba	0,4 Aa	0,2 Ba
Sem Irrigação		0,4 Aa	0,0 Ca	0,0 Cb	0,2 Bb	0,2 Ba

Cis-Thujopsenal						
Com Irrigação	1708	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Bb	0,5 Aa
Sem Irrigação		0,0 Ca	0,0 Ca	0,0 Ca	0,1 Ba	0,5 Aa
Ciclosoicheleno						
Com Irrigação	1407	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,3 Aa
Sem Irrigação		0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,3 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação aos teores de açúcares solúveis totais, foi possível observar que em plantas irrigadas a aplicação de cálcio e ácido glutâmico proporcionaram aumento nas concentrações. Após a suspensão da irrigação, a aplicação do composto bioestimulante completo proporcionou aumento nos teores destas macromoléculas. Ainda ao comparar-se o efeito da aplicação dos compostos entre plantas irrigadas e não irrigadas, foi possível observar que em condições de ausência de irrigação os compostos bioestimulante completo, extrato de alga marinha e ácido glutâmico promovem médias superiores quando comparadas a aplicação destes compostos em plantas irrigadas (Tabela 6.4).

Para os teores de açúcares redutores não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos. Por outro lado, para os teores de proteínas solúveis totais, observou-se que em tratamentos irrigados a aplicação do ácido glutâmico proporciona aumento dos teores. Após a suspensão da irrigação, a aplicação de extrato de alga marinha, ácido glutâmico e cálcio promovem aumento respectivamente nos teores de proteínas solúveis totais. Ainda, ao comparar o efeito da aplicação de extrato de alga marinha e ácido glutâmico nos diferentes níveis de irrigação é possível observar que em plantas não irrigadas estes compostos promovem acréscimos nos teores destas macromoléculas quando comparado aos tratamentos plantas irrigados.

Com exceção do ácido glutâmico o qual foi igual à testemunha, todos os demais tratamentos promoveram aumentos dos teores de aminoácidos em plantas irrigadas. Após a suspensão da irrigação, a aplicação do composto bioestimulante completo e cálcio aumentaram os teores de aminoácidos totais. Ao comprar-se o efeito da aplicação dos compostos entre plantas irrigadas e não irrigadas, foi possível observar que após a suspensão da irrigação, a aplicação do composto bioestimulante completo, e ácido glutâmico promovem médias superiores aos tratamentos irrigados.

As concentrações de alguns metabólitos são altamente modificadas em função da desidratação. As concentrações de sacarose nos tecidos foliares tendem a aumentar logo

quando as plantas são submetidas à seca e se mantêm altas até o final deste período. Entretanto, as concentrações de glicose tendem a decrescer. Os níveis de prolina têm resposta semelhante aos da sacarose (LIU et al., 2007). Com base nos resultados destes autores e nos resultados obtidos para açúcares totais e redutores não foi possível inferir se os compostos aplicados promoveram resistência das plantas de patchouli aos baixos níveis de umidade do substrato. Uma vez que a quantificação de açúcares redutores, os quais são utilizados pelas plantas em processos metabólicos, não foram estatisticamente diferentes entre si.

Em condições de deficiência hídrica é relatado a diminuição dos teores de proteínas totais e aumento das concentrações de aminoácidos. Tais alterações seriam resultantes da quebra de proteínas de reservas das plantas e diminuição da síntese de novas proteínas, uma vez que a desidratação da planta afeta todo seu processo bioquímico (COSTA et al., 2008; LECHINOSKI et al., 2007). No presente trabalho foi possível observar que em condições de restrição hídrica a utilização de extrato de alga marinha e ácido glutâmico tende a ser benéfica às plantas. Pois mesmo não havendo diferença estatística entre os teores de aminoácidos em relação à testemunha, quando utilizados os teores de proteínas, nestas condições, foram superiores aos demais tratamentos. Indicando que mesmo em condições de deficiência hídrica, a utilização destes compostos pode não promover acréscimo nas taxas metabólicas da planta, entretanto, consegue-se manter um nível metabólico que permita a sobrevivência da planta.

Tabela 6. 4 - Concentração de açúcares solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca), açúcares redutores ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca), proteínas solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) e aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca
Açúcares Totais					
Com irrigação	0,565 Ca	0,592 Cb	0,590 Cb	0,657 Bb	0,785 Aa
Sem irrigação	0,545 Da	0,845 Aa	0,792 Ba	0,735 Ca	0,762 BCa
Açúcares Redutores					
Com irrigação	0,014 ns	0,013 ns	0,016 ns	0,017 ns	0,016 ns
Sem irrigação	0,016 ns	0,017 ns	0,017 ns	0,019 ns	0,018 ns
Proteínas					
Com irrigação	0,22 Ba	0,15 Ca	0,15 Cb	0,29 Ab	0,24 Ba
Sem irrigação	0,16 Cb	0,15 Ca	0,29 Aa	0,32 Aa	0,21 Bb
Aminoácidos					
Com irrigação	0,230 Bb	0,299 Ab	0,321 Aa	0,228 Bb	0,317 Aa
Sem irrigação	0,277 Ca	0,376 Aa	0,262 Cb	0,267 Ca	0,304 Ba

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo

Em plantas irrigadas foi possível observar que a aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados promoveram o decréscimo nos teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais. Após a suspensão da irrigação a aplicação do bioestimulante também promoveu decréscimo nos teores de clorofila *a*, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha. Ainda nestas condições, houve aumento dos teores de clorofila *b* e clorofilas totais após a aplicação de ácido glutâmico. Para os teores de carotenóides não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 6.5).

Os resultados obtidos para os teores de clorofila *b* e totais estão de acordo com os encontrados por Sheata et al. (2011) em plantas de *Apium graveolens* L. var. *rapaceum* onde a aplicação de extratos de aminoácidos contendo ácido glutâmico promoveram aumento nas concentrações de clorofilas. O aumento das concentrações de clorofilas *b* e totais em plantas não irrigadas pode estar relacionado ao fato de que o ácido glutâmico é o precursor utilizado na síntese de clorofilas. Deste modo, a sua aplicação em condições de deficiência hídrica pode ter possibilitado a manutenção de um nível de síntese clorofilas o qual permitiu a manutenção

de uma taxa fotossintética, mesmo que reduzida, destas plantas durante o período as quais não foram irrigadas.

Tabela 6. 5 - Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca), clorofila *b* ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca), clorofilas totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) e carotenóides ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca
Clorofila <i>a</i>					
Com irrigação	0,201 Aa	0,170 Ba	0,134 Ca	0,162 BCa	0,131 BCa
Sem irrigação	0,170 Ab	0,132 Bb	0,144 ABa	0,144 AB a	0,150 Aba
Clorofila <i>b</i>					
Com irrigação	0,107 Aa	0,77 Ba	0,72 Ba	0,90 ABb	0,72 Bb
Sem irrigação	0,77 Bb	0,70 Ba	0,70 Ba	0,100 Aa	0,82 Aba
Clorofilas Totais					
Com irrigação	0,357 Aa	0,310 Ba	0,295 Ba	0,322 Aba	0,295 Ba
Sem irrigação	0,307 ABb	0,285 Ba	0,297 Ba	0,337 Aa	0,317 Ba
Carotenóides					
Com irrigação	0,55 ns	0,52 ns	0,45 ns	0,50 ns	0,42 ns
Sem irrigação	0,52 ns	0,42 ns	0,45 ns	0,47 ns	0,50 ns

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo

Para temperatura foliar, resistência estomática e transpiração das plantas não houve interação significativa entre os fatores, entretanto houve influência do fator biestimulantes de forma isolada. A temperatura foliar decresce com a aplicação de cálcio, extrato de alga marinha e ácido glutâmico respectivamente. A aplicação do composto bioestimulante completo promoveu temperaturas foliares superiores ao tratamento testemunha. A maior resistência estomática foi observada após a aplicação de cálcio e a aplicação de extrato de alga marinha, ácido glutâmico e composto bioestimulante diminuíram a resistência estomática das plantas em relação à testemunha. Em relação à transpiração das plantas, foi possível observar que somente a aplicação de cálcio promoveu médias menores em relação à testemunha (Tabela 6.6).

Tabela 6. 6 - Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$), resistência estomática ($\text{diff. Res. s cm}^{-1}$) e transpiração ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) em tecidos foliares de patchouli após aplicação de bioestimulante e seus compostos isolados. Bioestimulante (BST), extrato de alga marinha (EAM), ácido L-glutâmico (GLU) e cálcio (Ca).

	Testemunha	BST	EAM	GLU	Ca	Média
Temperatura Foliar						
Com irrigação	28,720	29,020	28,270	27,100	28,570	28,34 a
Sem irrigação	28,850	29,600	27,920	27,370	28,670	28,48 a
Média	28,78 AB	29,31 A	28,10 C	27,23 D	28,62 BC	
Resistência Estomática						
Com irrigação	0,585	0,427	0,572	0,490	0,665	0,548 a
Sem irrigação	0,580	0,465	0,500	0,455	0,822	0,564 a
Média	0,582 B	0,446 C	0,536BC	0,472 BC	0,743 A	
Transpiração						
Com irrigação	2,150	3,700	2,090	2,620	1,790	2,47 a
Sem irrigação	2,160	3,500	2,550	2,700	1,410	2,46 a
Média	2,15 C	3,60 A	2,32 BC	2,66 B	1,60 D	

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados observados neste trabalho sugerem que se testado em menores concentrações, e em maior número de aplicações o ácido glutâmico possa ser utilizado em plantas de patchouli em condições de baixa disponibilidade hídrica com o intuito de se minimizar os efeitos da seca. Tendo em vista, o fato da aplicação deste composto ter diminuído a temperatura foliar e mantido o nível de transpiração das plantas, uma vez que a perda de calor por meio de transpiração é um mecanismo fisiológico que ajuda a reduzir as temperaturas foliares. Estes mecanismos são importantes, pois em situações de baixa disponibilidade hídrica a desidratação severa das células do mesofilo pode inibir a fotossíntese diminuindo o desenvolvimento vegetativo da mesma.

Somando-se a isso o fato da aplicação de ácido glutâmico, em condições de deficiência hídrica, ter aumentado a síntese de proteínas solúveis totais, clorofilas totais, área foliar e produtividade de óleo essencial sugere-se que nestas condições a aplicação deste produto é benéfica. Pois, manteve os processos de síntese primários sem alterar a produtividade de óleo essencial o qual confere a importância econômica da espécie.

Entretanto, novos estudos devem ser realizados observando-se o número aplicações destes compostos em diferentes concentrações. Uma vez que é amplamente descrito na literatura que a utilização de compostos bioestimulantes e o extrato de alga marinha exercem efeito protetor das plantas ao déficit hídrico, quando utilizados em baixas concentrações frente a um maior número de aplicações.

6.4. CONCLUSÕES

A aplicação de ácido glutâmico em plantas de patchouli submetidas à ausência de irrigação promove maior área foliar, massa seca de folhas e consequentemente maior produtividade do óleo essencial, bem como o aumento do teor dos compostos majoritários no mesmo. Além disto, promove acréscimo nas concentrações de proteínas solúveis totais, clorofilas *b* e totais, diminui a temperatura foliar das plantas.

6.5. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**, 4th ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corp., 2007, 804p.

ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, Departamento de Fitotecnia, 1999.

BATES, L.S.; WALDERN, R.P.; TEARE, I.D.; Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v.39. p.205- 207, 1973.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, L. M; CASALI, V. W. D.; LISBOA, S. P.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, 2006.

COSTA, R. C. L.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; MAIA, P. S. P.; ALVES, G. A. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Biochemical and physiological responses in two *Vigna uviculata* (L.) Walp. cultivars under water stress. **Jouranl of Agronomy**. v. 7, n. 1, p. 98-101, 2008.

DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 454, n. 2, p. 123-136, 2006.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 106, p. 243-252, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J, K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.

FERNANDES, P. D. Análise de crescimento e desenvolvimento vegetal. Campina Grande: UFPB, Departamento de Engenharia Agrícola, 2000. 22p.

FIEHN, O. Metabolomics—the like between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155–171. , 2002.

GUBAREVA, L.V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Research**. v. 103, p. 199-203, 2004.

HENDERSON, W.; JAMES, W. H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.

HSU, H.C.; YANG, W.C.; TSAI, W.J.; CHEN, C.C.; HUANG, H.Y.; TSAI, Y.C. α -Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 345, n.7, p.1033–1038, 2006.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; CRITCHLEY, A. T.; CRAIGIE, J. S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. **Journal of Plant Growth Regulation**. v.28, p. 386-399, 2009.

KISO, M.; MITAMURA, K.; SAKAI-TAGAWA, Y.; SHIRAISHI, K.; KAWAKAMI, C.; KIMURA, K.; HAYDEN, F.G.; SUGAYA, N.; KAWAOKA, Y. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: Descriptive study. **Lancet**, v. 364, p.759-765, 2004.

KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y.; NAGAI, T.; SATO, N.; YAMADA, H. Patchouli alcohol: In vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. **Journal of Natural Medicine**. v. 16, p. 6489-6501, 2011.

LEICHNOSKI, A.; FREITAS, J. M. N.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas solúveis totais em folhas de teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, s. 2, p. 927-929, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes**. In: Methods in enzymology. Academic Press Inc., v 148, p. 350-382, 1987.

LIU, Y. B.; WNAG, G.; LIU, J.; ZHAO, X.; TAN, H. J.; LI, X. R. Anatomical, morphological and metabolic acclimation in the resurrection plant *Reaumuria soongorica* during dehydration and rehydration. **Journal of Arid Environments**, v. 70, p.183–194, 2007.

LU, T. C.; LIAO, J. C.; Huang, T. H.; LIN, Y. C.; LIU, C. Y.; CHIU, Y. J.; PENG, W. H. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, p. 1-9, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 3, p 426-428, 1959.

MIYAZAWA, M.; Y. OKUNO, Y.; S.-I. NAKAMURA, S.I.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.3, p. 642–647, 2000.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L – glutâmico e cálcio em feijoeiro. **Scientia Agraria**, v. 9, n.4, p. 431-437, 2008.

OMIDI, H. Changes of Proline Content and Activity of Antioxidative Enzymes in Two Canola Genotype under Drought Stress. **American Journal of Plant Physiology**. v. 5, n. 6, p. 338-349, 2010.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agrônômico e Fundação IAC, Campinas, p. 285, 1996.

RAYORATH, P.; JITHESH, M. N.; FARID, AMIR.; KHAN, W.; PALANISAMY, R.; HANKINS, S. D.; CRITCHLEY, A. T.; PRITHIVIRAJ, B. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Journal of Applied Phycology**. v. 20, p. 423–429, 2008.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SCHIMIIDT, R. E.; ERVIN, E. H.; ZHANG, X. Questions and answers about biostimulants. **Golf Course Manage**, v. 71, p. 91–94, 2003.

SHEHATA, S.M.; ABDEL-AZEM, H.S.; EL-YAZIED, A.A.; EL-GIZAWY, A.M. Effect of Foliar Spraying with Amino Acids and Seaweed Extract on Growth Chemical Constitutes,

Yield and its Quality of Celeriac Plant. **European Journal of Scientific Research**. v.58, n.2. p. 257-265, 2011.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: Orlando: **American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396, 2006.

SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Beth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, p. 101-107, 2002.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Sistemática Botânica. Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 639 p., 2005.

STORCK, R. C. **Sombreamento ácido giberélico e extrato de alga marinha no desenvolvimento e produção de óleos essenciais em patchouli**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação Agronomia Produção Vegetal 98p., 2008.

SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.;FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 82, p.251–257, 2005.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**,v.11, p. 463-71, 1963.

VIERA, E. L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja, feijoeiro e arroz**. 122p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WU, H.; LI, B.; WANG, X.; JIN, M.; WANG, G. Inhibitory Effect and Possible Mechanism of Action of Patchouli Alcohol against Influenza A (H2N2) Virus. **Molecules**. v. 16, p. 6489-6501, 2011.

WU, Y.G., GUO, Q.S., ZHENG, H.Q. Studies on residuals of organochlorine pesticides and heavy metals in soil of planting base and *Pogostemon cablin*. **China Journal Chinese Materia Medica**. v. 33, p. 1528–1532, 2008.

WU, Y.G.; GUO, Q.S.; ZHENG, H.Q. Studies on residuals of organochlorine pesticides and heavy metals in soil of planting base and *Pogostemon cablin*. **China Journal Chinese Materia Medica**. v. 33, p. 1528–1532, 2008.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant Cell Physiology**, v.38, p. 1095-1102, 1997.

ZHANG, X.; ERVIN, E. H. Cytokinin containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping. **Crop Science** , v.44, p.1-10, 2004.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoullic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**,Tokio, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoullic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**,Tokio, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

ZHI-LIN, Y; CHUAN-CHAO, D; LIAN-QING,C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 1266-1271, 2007.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A presença de gotículas de óleo essencial no parênquima clorofiliano paliçádico diferencia a espécie estudada das demais pertencentes à família Lamiaceae. Estão presentes, permeando todo o parênquima clorofiliano paliçádico, idioblastos os quais possuem evidências de conter óleos essenciais. Há presença de células contendo óleo essencial em todos os órgãos vegetativos de patchouli, entretanto, a maior concentração destas é observada na lâmina foliar. É possível distinguir seis tipos de tricomas com morfologia e padrão de distribuição distinta nos diferentes órgãos vegetativos de patchouli.

Em condições de baixo suprimento hídrico ocorre uma drástica diminuição do desenvolvimento vegetativo e rendimento do óleo essencial. Nestas condições também ocorrem alterações bioquímicas, anatômicas e fisiológicas desfavoráveis ao desenvolvimento da espécie.

A aplicação de ácido glutâmico em plantas submetidas à ausência de irrigação promove maior área foliar, massa seca de folhas e consequentemente maior produtividade do óleo essencial, bem como o aumento do teor dos compostos majoritários no mesmo. Além disto, a aplicação do ácido glutâmico em plantas submetidas à deficiência hídrica aumenta a concentração de proteínas solúveis totais, clorofilas *b* e totais, diminui a temperatura foliar das plantas.

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 1999.

BETTAIEB, I.; ZAKHAMA, N.; AIDI WANNES, W.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, v.120, p. 271–275, 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. v 32, n.3, p. 588-594, 2009.

BURÈ, C.M.; SELLIER, N.M. Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using GC/MS (EI/CI). **Journal of Essential Oil Research**. v. 16, n.1, p. 17-19, 2004.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2 ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004a. p. 48-66.

CARVALHO, L. M; CASALI, V. W. D.; LISBOA, S. P.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, 2006.

DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, n. 2, p. 123-136, 2006.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNETTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 106, p. 243-252, 2005.

EIASU, B. K.; STEYN, J. M.; SOUNDY, P. Rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum* X *P. radens*) growth and essential oil yield response to different soil water depletion regimes **Agricultural Water Management**, v. 96, n. 6, p. 991–1000, 2009.

EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchuli.** Florianópolis, 2004. 58p. (Epagri. Sistemas de Produção, 37).

FAROOQI, A. H. A; SANGWAN, N. S.; SANGWAN. R. S. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation** v.29, n. 3, p 181-187, 1999.

FIEHN, O. Metabolomics—the like between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p.155–171. , 2002.

GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v. 89, p.255-260, 2001.

GERSHENZON,J.; McCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, v. 122, p. 205-213, 2000.

GUBAREVA, L.V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Research**. v. 103, p. 199-203, 2004.

HENDERSON, W.; JAMES, W.H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**,Egham, v. 9, p. 1219-1228, 1970.

HU L.F.; LI, S.P.;CAOB, H.; LIU, J.J.; GAO J.L .; YANG, F.Q.;. WANG, Y.T. GC–MS. Fingerprint of *Pogostemoncablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Hong Kong, v.42.p. 200-206, 2006.

HSU, H.C.; YANG, W.C.; TSAI, W.J.; CHEN, C.C.; HUANG, H.Y.; TSAI, Y.C. α -Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 345, n.7, p.1033–1038, 2006.

JOLY, A. B. **Introdução à Taxionomia Vegetal**. 3 ed, São Paulo. Editora Nacional, 1996.

KHALID, K.H. A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**, v. 20, p. 289-296, 2006.

KISO, M.; MITAMURA, K.; SAKAI-TAGAWA, Y.; SHIRAISHI, K.; KAWAKAMI, C.; KIMURA, K.; HAYDEN, F.G.; SUGAYA, N.; KAWAOKA, Y. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: Descriptive study. **Lancet**. v. 364, p.759-765, 2004.

KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y.; NAGAI, T.; SATO, N.; YAMADA, H. Patchouli alcohol: In vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. **Journal Natural Medicine**. 2011

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Tradução: Prado, C. H. B. A. São Carlos: Rima, 2006.531 p.

LARIBI, B.; BETTAIEB, I.; KOUKIA, K.; SAHLIA, A.; MOUGUA, A.; MARZOUK, B. Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 372–379, 2009.

LIU, Y. B.; WNAG, G.; LIU, J.; ZHAO, X.; TAN, H. J.; LI, X. R. Anatomical, morphological and metabolic acclimation in the resurrection plant *Reaumuria soongorica* during dehydration and rehydration. **Journal of Arid Environments**, v. 70, p.183–194, 2007.

LU, T. C.; LIAO, J. C.; Huang, T. H.; LIN, Y. C.; LIU, C. Y.; CHIU, Y. J.; PENG, W. H. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, p. 1-9,

MACHADO, A. V. **Efeito do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* MART. (Cloranthaceae)**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. 2004, 59p.

MASETTO, M. A. M. **Ácido giberélico e extrato de alga marinha na produtividade e composição do óleo essencial de lavanda (*Lavandula dentata* L.)**.Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação Agronomia Produção Vegetal 96p., 2009.

MIYAZAWA, M.; Y. OKUNO,Y.; S.-I. NAKAMURA, S.I.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.3, p. 642–647, 2000.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L – glutâmico e cálcio em feijoeiro. **Scientia Agraria** , v. 9, n.4, p. 431-437, 2008.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

PIZARD, A.; ALYARI, M. R.; ZHELAB-SALMASI, S.; MOHAMMADI, A. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. **Journal of Agronomy**, v. 5, n. 3, p. 451-455, 2006.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. Botânica econômica brasileira. 2ed., Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, 248p.

SADRAS, V. O.; MILROY, S. P. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review. **Field Crops Research**, v. 47, p. 253-266. 1996.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n.6, p. 3-21, 2001.

SILVA, F. da; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa, UFV/DFT, 2000.135 p.

SILVA, M.A.S.; EHLERT, P.A.D.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Composition and chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Pogostemon patchouli* pellet leaves. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 629, p. 145-147, 2004.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L.C. A.; et al., Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemoncablin* (Blanco) Beth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 16, p. 101-107, 2002.

SOLINAS, V. S.; GESSA, D.C.; BAZZONI, A.; LODDO, M.A.; SATTA, D. Effects of water and nutritional conditions on *Rosmarinus officinalis* L. phenolic fraction and essential oil yield. **Revista Italiana Eppos**, v. 19, p. 189-198, 1996.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Sistemática Botânica. Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 639 p., 2005.

STORCK, R. C. **Sombreamento, ácido giberélico e extrato de alga marinha no desenvolvimento e produção de óleos essenciais em patchouli.** 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 82, n.3, p.251–257, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** Trad. SANTARÉM et.al – 3 ed.- Porto Alegre: artmed, 2004

VIEIRA, E. L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja, feijoeiro e arroz**, 122f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

ZHANG, X.; ERVIN, E. H. Cytokinin containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping. **Crop Science**, v.44, p.1-10, 2004.

ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**,Tokio, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.

ZHI-LIN, Y; CHUAN-CHAO, D; LIAN-QING,C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 1266-1271, 2007.

ZHU, B. C. R.; HENDERSON, G.; YU, Y.; LAINE, R. A. **Jouranl Agricultural Food Chemistry**.v. 51, p. 4580-4585, 2003.

WU, Y.G., GUO, Q.S., ZHENG, H.Q. Studies on residuals of organochlorine pesticides and heavy metals in soil of planting base and *Pogostemon cablin*. **China Journal Chinese Materia Medica**. v. 33, p. 1528–1532, 2008.

WU, H.; LI, B.; WANG, X.; JIN, M.; WANG, G. Inhibitory Effect and Possible Mechanism of Action of Patchouli Alcohol against Influenza A (H2N2) Virus. **Molecules**. v. 16, p. 6489-6501, 2011.